

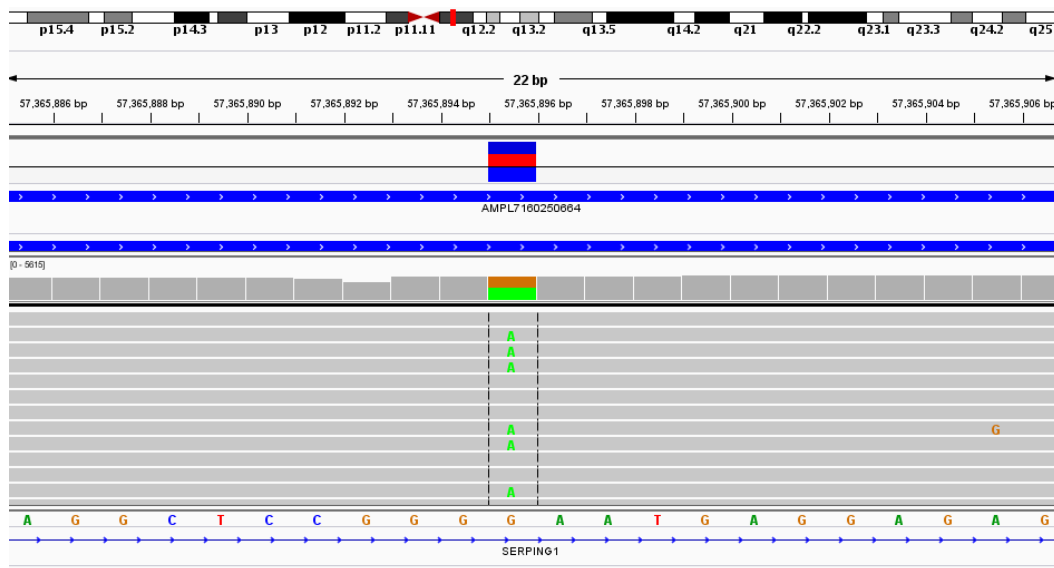


**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**  
**Σχολή Επιστημών Υγείας**  
**Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**  
**ΒΑΤΣΙΟΥ ΣΟΦΙΑ**

**Ανάπτυξη πρωτοκόλλου αλληλούχησης νέας γενεάς (Next- Generation Sequencing, NGS) για την ανάλυση του γονιδίου *SERPINC1*.**



**ΛΑΡΙΣΑ**  
**ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2016**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Αναστάσιος Γερμενής**  
*Καθηγητής Ανοσολογίας*  
*Επιβλέπων*

**Χατζηγεωργίου Γεώργιος**  
*Καθηγητής Νευρολογίας*

**Ευθυμία Πετεινάκη,**  
*Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας*

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ.....	2
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	4
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ .....	5
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	7
A.1 ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟ ΑΓΓΕΙΟΟΙΔΗΜΑ .....	8
A.2 ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ <i>SERPING1</i> .....	9
A.2.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ .....	9
A.2.2 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΟΥ C1-INH .....	10
A.2.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ.....	12
A.2.4 ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΧΕΙ Ο C1-INH .....	13
A.2.5 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>SERPING1</i> .....	16
A.3 ΜΕΘΟΔΟΣ SANGER.....	18
A.4 ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΝΕΑΣ ΓΕΝΙΑΣ (NGS) .....	21
A.4.1 454 ΣΥΣΤΗΜΑ/ ROCHE.....	24
A.4.2 ILLUMINA .....	26
A.4.3 SOLID.....	26
A.4.4 ION TORRENT.....	28
A.5 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗΣ.....	29
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	30
B.1 ΣΚΟΠΟΣ .....	31
B.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΥΛΙΚΑ .....	32
B.3 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ .....	37
B.3.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ PANEL ΣΤΗΝ ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΑ ΤΗΣ AMPLISEQ.....	37
B.3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA .....	37
B.3.3 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ .....	38
B.3.4 PCR ΣΕ ΓΑΛΑΚΤΩΜΑ .....	38
B.3.5 ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ (ENRICHMENT).....	39
B.3.6 ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ION PGM .....	39
B.3.7 ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ .....	40
B.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	50
B.5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	54
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ .....	62
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	84
ABSTRACT .....	85
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	86

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το κληρονομικό αγγειοοίδημα είναι μια σπάνια, δυνητικά απειλητική για τη ζωή γενετική διαταραχή που εκδηλώνεται με επαναλαμβανόμενα επεισόδια οιδήματος και προκαλείται από έλλειψη του αναστολέα της C1 εστεράσης. Ο αναστολέας της C1 εστεράσης κωδικοποιείται από το γονίδιο *SERPING1*, το οποίο παρουσιάζει πάνω από 450 μεταλλάξεις που σχετίζονται με το κληρονομικό αγγειοοίδημα. Η υπάρχουσα μεθοδολογία που ακολουθείται από τα εργαστήρια για την αλληλούχηση του γονιδίου *SERPING1* απαιτεί τη χρήση τριών διαφορετικών μεθόδων: της Sanger για την ανίχνευση των SNVs και των MNVs, της MLPA για την ανίχνευση των προσθηκών και των ελλείψεων και της Long Range PCR για την ανίχνευση των μεγάλων προσθηκών και των μεγάλων ελλείψεων. Η χρήση τριών διαφορετικών μεθόδων καθιστά την αλληλούχηση του γονιδίου χρονοβόρα και ακριβή. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η δημιουργία ενός πρωτοκόλλου αλληλούχησης του γονιδίου *SERPING1* το οποίο θα οδηγήσει στην αντικατάσταση των τριών αυτών μεθόδων με μία μέθοδο, την Αλληλούχηση Νέας Γενεάς. Η Αλληλούχηση Νέας Γενεάς είναι μία επαναστατική μέθοδος αλληλούχησης, η οποία δίνει τη δυνατότητα να λαμβάνουν χώρα περισσότερες αντιδράσεις ταυτόχρονα σε μικρότερο χρονικό διάστημα και με μεγαλύτερη ταχύτητα. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία εξετάστηκαν με τη χρήση της Αλληλούχησης Νέας Γενεάς ήδη χαρακτηρισμένα δείγματα ασθενών που πάσχουν από κληρονομικό αγγειοοίδημα με σκοπό να επιβεβαιωθούν οι μεταλλάξεις που οδηγούν σε αυτή τη νόσο και να δημιουργηθεί ένα πρωτόκολλο εργασίας που θα περιλαμβάνει αυτή τη μέθοδο αλληλούχησης. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στο μεγαλύτερο μέρος της στην εταιρεία CeMIA σε συνεργασία με το εργαστήριο Ανοσολογίας- Ιστοσυμβατότητας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Για τη σημαντική συμβολή του στην ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον κ. Αναστάσιο Γερμενή, καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την αμέριστη συμπαράσταση και την εμπιστοσύνη με την οποία με περιέβαλε και για την υλικότεχνική εργαστηριακή υποδομή του εργαστηρίου που μου προσέφερε ώστε να ολοκληρώσω επιτυχώς τη μελέτη μου. Επιπρόσθετα, του είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων και τον ευχαριστώ θερμά για τη διαρκή καθοδήγηση και υποστήριξή του σε όλο αυτό το διάστημα. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, τον κ. Χατζηγεωργίου Γεώργιο, Καθηγητή Νευρολογίας και την κ. Ευθυμία Πετεινάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για το χρόνο που αφιέρωσαν για τη μελέτη και την αξιολόγηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Επιπλέον, ευχαριστίες οφείλω στην διδάκτορα Μαρία Ζαμανάκου και τους υποψήφιους διδάκτορες Γεδεών Λουλέ και Λουκία Ποταμιάνου για την πολύτιμη βοήθειά τους, για τις χρήσιμες συμβουλές τους, την καθοδήγηση και την άψογη συνεργασία που είχα μαζί τους. Ήταν διαθέσιμοι για μένα και ιδιαιτέρως προσιτοί από τις πρώτες ημέρες παρουσίας μου στο εργαστήριο. Με τη βοήθεια και τη στήριξή τους, καθώς και με τις γνώσεις που μοιράστηκαν μαζί μου κατάφερα να φέρω εις πέρας την παρούσα εργασία.

Τέλος, κρίσιμη και σημαντική ήταν η συμβολή και η συμπαράσταση της οικογένειάς μου, ιδιαιτέρως της αδερφής μου, Ιωάννας, που αποτέλεσε με το δικό της τρόπο στήριγμα για μένα συμβάλλοντας στην επιτυχή διεκπεραίωση των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

<b>ATP</b> (Adenosine Triphosphate)	Τριφωσφορική αδενοσίνη
<b>bp</b> (Base Pairs)	Ζεύγη βάσεων
<b>C1-INH</b> (C1 esterase inhibitor)	Αναστολέας της C1 εστεράσης
<b>cffDNA</b> (Cell-free fetal DNA)	Εμβρυικό DNA ελεύθερων κυττάρων
<b>ddNTPs</b> (Di-deoxynucleosidetriphosphates)	Τερματικά διδεοξυριβονουκλεοτιδίων
<b>dNTPs</b> (Deoxynucleosidetriphosphates)	Δεοξυριβονουκλεοτίδια
<b>FFPE DNA</b> (Formalin-fixed, paraffin-embedded DNA)	DNA επεξεργασμένο με παραφίνη
<b>gDNA</b> (Genomic DNA)	Γεωμικό DNA
<b>HAE</b> (Hereditary angioedema)	Κληρονομικό αγγειοοίδημα
<b>H-DNA</b> (Hinged DNA)	Αρθρωτό DNA
<b>HMWK</b> (High-Molecular-Weight Plasma Kininogens)	Υψηλού-μοριακού-βάρους κινινογόνα του πλάσματος
<b>HNF-1</b> (Hepatocytes Nuclear Factor-1)	Πυρηνικός παράγοντας ηπατοκυττάρων
<b>Hsp90</b> (Heat Shock Protein 90)	Πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90
<b>IGV</b> (Integrative Genomics Viewer)	Πρόγραμμα Προβολής Γονιδιώματος
<b>IGV</b> (Intergrative Genomics Viewer)	Πρόγραμμα προβολής γονιδιωμάτων
<b>IL-1</b> (Interleukin 1)	Ιντερλευκίνη 1
<b>IL-6</b> (Interleukin 6)	Ιντερλευκίνη 6
<b>INF-<math>\alpha</math></b> (Interferon- $\alpha$ )	Ιντερφερόνη- $\alpha$
<b>INF-<math>\beta</math></b> (Interferon- $\beta$ )	Ιντερφερόνη- $\beta$
<b>INF-<math>\gamma</math></b> (Interferon- $\gamma$ )	Ιντερφερόνη- $\gamma$
<b>Inr</b> (Initiator Element)	Στοιχείο έναρξης
<b>ISREs</b> (IFN-stimulated response elements)	Στοιχεία διεγερμένης απόκρισης INF

<b>M-CSF</b> (Macrophage colony-stimulating factor)	Παράγοντας διέγερσης αποικίας μακροφάγων
<b>MLPA</b> (Multiplex ligation-dependent probe amplification)	Πολλαπλή ενίσχυση με πρόσδεση εξαρτώμενη από ανιχνευτή
<b>MNV</b> (Multi-Nucleotide Variant)	Πολυμορφισμός περισσότερων νουκλεοτιδίων
<b>NGS</b> (Next Generation Sequencing)	Αλληλούχηση Νέας Γενιάς
<b>PCR</b> (Polymerase Chain Reaction)	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
<b>PGM</b> (Personal Genome Machine)	Πλατφόρμα NGS της Ion Torrent
<b>PTP</b> (PicoTiterPlate)	Ειδικά πιάτα αλληλούχησης της πλατφόρμας Roche
<b>RCL</b> (Reactive Centre Loop)	Βρόγχος ενεργοποίησης
<b>SNP</b> (Single Nucleotide Polymorphism)	Πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου
<b>SNV</b> (Single Nucleotide Variant)	Μεταβλητό Νουκλεοτίδιο
<b>Sp-1</b> (Specificity Protein 1)	-
<b>TFII-D</b> (Transcription factor II D)	Μεταγραφικός παράγοντας II D

# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---

## A.1 ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟ ΑΓΓΕΙΟΟΙΔΗΜΑ

Το κληρονομικό αγγειοοίδημα (Hereditary angioedema, HAE) είναι μία σπάνια ασθένεια που κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο<sup>1</sup> και προκαλείται από έλλειψη του αναστολέα της C1 εστεράσης (C1 esterase inhibitor, C1-INH)<sup>2</sup>. Εκδηλώνεται με την εμφάνιση επαναλαμβανόμενων επεισοδίων οιδήματος είτε υποδόρια είτε στους βλεννογόνους. Πιο συγκεκριμένα, εμφανίζεται πρήξιμο στα χέρια, στα πόδια, στο πρόσωπο, στο δέρμα, στις γενετικές περιοχές, αλλά και στα εσωτερικά όργανα και στο αναπνευστικό σύστημα (εικ.1). Η νόσος αυτή μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο, με την πρόκληση ασφυξίας μετά την εμφάνιση λαρυγγικού οιδήματος, το οποίο εμφανίζεται στο 50% των ασθενών<sup>3</sup>. Το HAE έχει συχνότητα 1 στις 10.000 με 1 στις 50.000 και δεν φαίνεται να εμφανίζει κάποια διαφοροποίηση σε φύλα και φυλές<sup>4</sup>. Παρόλα αυτά, η εμφάνιση των συμπτωμάτων της ασθένειας στις γυναίκες μπορεί να είναι πιο σοβαρή, λόγω των διακυμάνσεων των επιπέδων των οιστρογόνων<sup>5</sup>.

Υπάρχουν τρεις τύποι HAE: Ο τύπος I στον οποίο εμφανίζεται μειωμένη η ποσότητα του C1-INH και αποτελεί το 80-85% των περιπτώσεων. Ο τύπος II χαρακτηρίζεται από φυσιολογικά ή αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης C1-INH με τη διαφορά ότι η πρωτεΐνη δεν είναι λειτουργική. Αποτελεί το 10-15% των περιπτώσεων. Οι δύο αυτοί τύποι παρουσιάζουν δυσδιάκριτη κλινική εικόνα, αλλά προκαλούνται από διαφορετικές μεταλλάξεις. Μεταλλάξεις στον C1-INH που προκαλούν τον τύπο I συμβαίνουν σε όλο το γονίδιο και οδηγούν σε περικομμένη ή λανθασμένα αναδιπλωμένη πρωτεΐνη που δεν εκκρίνεται αποτελεσματικά. Οι μεταλλάξεις που προκαλούν το τύπο II συνήθως λαμβάνουν χώρα στο εξώνιο 8 ή κοντά στο ενεργό κέντρο, οδηγώντας σε μεταλλαγμένη πρωτεΐνη που εκκρίνεται, αλλά είναι μη λειτουργική. Τέλος, υπάρχει και ο τύπος III κληρονομικού αγγειοοιδήματος στον οποίο η λειτουργικότητα της C1-INH είναι φυσιολογική και συσχετίζεται με αυξημένα επίπεδα οιστρογόνων<sup>6</sup>.



**Εικόνα 1:** Χαρακτηριστικά παραδείγματα ατόμου με κληρονομικό αγγειοοίδημα. Στις εικόνες αριστερά τα άτομα είναι σε φυσιολογική κατάσταση, ενώ στις δεξιά βρίσκονται σε κρίση.<sup>7</sup>



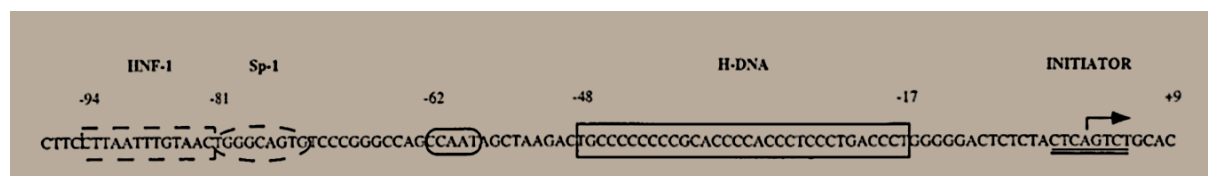
## A.2 Το Γονίδιο *SERPING1*

Το *SERPING1* είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί τον C1-INH, μία γλυκοπρωτεΐνη που ανήκει σε μία οικογένεια αναστολέων πρωτεασών σερίνης, που ονομάζονται σερπίνες<sup>8</sup>.

Το γονίδιο *SERPING1* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11q12→q13.1. Περιλαμβάνει 8 εξόνια και 7 ιντρόνια και έχει μέγεθος 17.159 bp<sup>9</sup>. Στα ιντρόνια του γονιδίου αυτού υπάρχουν 17 αλληλουχίες Alu<sup>1</sup>. Οι αλληλουχίες αυτές είναι σύντομα επαναλαμβανόμενα τμήματα DNA περίπου 300 βάσεων και υπάρχουν σε μεγάλο αριθμό στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Οι αλληλουχίες Alu είναι τα πιο συχνά μεταθετά στοιχεία, τα οποία αυξάνουν την πιθανότητα μεταλλαξιγένεσης<sup>10</sup>. Πιο συγκεκριμένα, οι διαγραφές και οι διπλασιασμοί που οφείλονται σε αυτές τις αλληλουχίες αποτελούν το 15-20% όλων των μεταλλάξεων στο γονίδιο του *SERPING1*<sup>11</sup>.

### A.2.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ

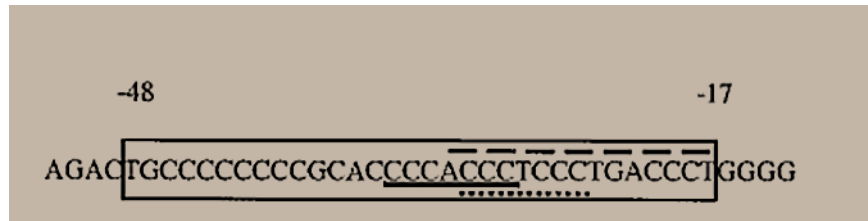
Ο υποκινητής του γονιδίου *SERPING1* (εικ.2) διαφέρει σε σχέση με τους υποκινητές άλλων γονιδίων, καθώς δεν διαθέτει TATA box, το οποίο αποτελεί θέση πρόσδεσης πρωτεϊνών μεταγραφής. Τη λειτουργία του TATA box υποκαθιστά το στοιχείο έναρξης (Initiator element, Inr) που έχει την αλληλουχία CTCAGTCT και εκτείνεται από τις θέσεις -3 με +5. Το C1-INH Inr ανακαλύφθηκε πρώτα στην οικογένεια των TdT γονιδίων<sup>12</sup>. Το Inr συμβάλλει στην εκκίνηση της μεταγραφής και έχει αποδειχθεί ότι από μόνο του μπορεί να αντικαταστήσει την έλλειψη του TATA box στον υποκινητή του γονιδίου αυτού<sup>13</sup>. Στο Inr προσδένεται ο μεταγραφικός παράγοντας II D (TFII-D) και μπορεί να αναγνωριστεί και από την RNA πολυμεράση II<sup>12</sup>.



**Εικόνα 2:** Σχηματική απεικόνιση των τμημάτων του υποκινητή του C1-INH. Τα πιθανά HNF-1, Sp-1 και το CAAT box βρίσκονται στις θέσεις -94 με -81, -80 με -72 και -62 με -59 αντίστοιχα. Το Inr είναι υπογραμμισμένο στις θέσεις -3 με +5 και η θέση έναρξης της μεταγραφής φαίνεται με το βέλος. Η αλληλουχία του H-DNA βρίσκεται στην περιοχή -48 με -17.

Επιπρόσθετα, ο υποκινητής του γονιδίου από το οποίο κωδικοποιείται ο C1-INH περιέχει ένα αρθρωτό DNA (Hinged DNA, H-DNA) το οποίο βρίσκεται στην περιοχή -48 με -17. Η ακολουθία H-DNA περιγράφεται ως πολυπυριμινική-πολυπυριμιδινική, η οποία έχει τη δυνατότητα να σχηματίζει τρίκλωνη/μονόκλωνη H-μορφή. Πολυπυριμιδικές- πολυπυριμινικές αλληλουχίες αποτελούν το 1% του ανθρώπινου γονιδιώματος<sup>15</sup>. Μια παρόμοια πολυπυριμινική-πολυπυριμιδινική αλληλουχία υπάρχει και στον υποκινητή του γονιδίου *c-MYC* στην περιοχή -141 με -115<sup>14</sup>. Στο γονίδιο *c-MYC* η περιοχή αυτή αποτελεί περιοχή πρόσδεσης ριβονουκλεοπρωτεΐνης και άλλων ρυθμιστικών παραγόντων της μεταγραφής, οι οποίοι δρουν ως θετικοί ρυθμιστικοί παράγοντες<sup>14</sup>. Η λειτουργία του H-DNA για κάποια γονίδια όπως τα *c-MYC*, *TGFB3* και *Drosophila hsp26* είναι διεγερτική και για κάποια άλλα όπως τα γονίδια *g-globin* (*HBG1* και *HBG2*) και τα γονίδια των υποδοχέων ανδρογόνων είναι ανασταλτική<sup>13</sup>. Ο ρόλος της περιοχής αυτής στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον C1-INH δεν είναι γνωστός, αλλά πιθανόν να ρυθμίζει τη δράση στοιχείων ανοδικά από τον υποκινητή.

Η πολυπυριμιδική-πολυπουρινική περιοχή εκτός από την δυνατότητα σχηματισμού τριπλής έλικας DNA, διαθέτει και πιθανά στοιχεία σύνδεσης μεταγραφικών παραγόντων. Το πρώτο στοιχείο αποτελεί μία περιοχή πρόσδεσης PuF (GGGTGGG) στο μη μεταγραφόμενο κλώνο. Το δεύτερο στοιχείο είναι ένα AC box, που αποτελείται από δύο επαναλήψεις ACCCT που διαχωρίζονται από 5 βάσεις (CCCTG), στο οποίο μπορεί να προσδένεται μία ριβονουκλεοπρωτεΐνη. Το τρίτο στοιχείο είναι μία παλινδρομική αλληλουχία (GGGAGGG) στο μη μεταγραφόμενο κλώνο που είναι ταυτόσημη με μία θέση δέσμησης στο *c-MYC* γονίδιο για μία πρωτεΐνη με δακτύλιο ψευδαργύρου (MAZ) (GGGAGGG) (εικ.3). Έχει αποδειχθεί ότι το στοιχείο PuF και/ή το AC box είναι σημαντικά για τη σωστή λειτουργία του υποκινητή<sup>13</sup>.



**Εικόνα 3:** Σχηματική απεικόνιση της πολυπυριμιδικής-πολυπουρινικής περιοχής στον υποκινητή του *C1-INH*. Η υποθετική αλληλουχία πρόσδεσης PuF υποδεικνύεται με έντονη υπογράμμιση, το AC box υποδεικνύεται από τη διακεκομμένη υπογράμμιση και η πιθανή αλληλουχία δέσμησης MAZ υποδεικνύεται από τις τελείες<sup>13</sup>.

Εκτός από το Inr και το H-DNA υπάρχουν και άλλα πιθανά ρυθμιστικά στοιχεία της μεταγραφής. Αρχικά πρέπει να αναφερθεί ο πυρηνικός παράγοντας των ηπατοκυττάρων (HNF-1) που βρίσκεται στην περιοχή -94 με -82 και αποτελεί απαραίτητο στοιχείο της μεταγραφής, ενισχύοντας τη δράση του υποκινητή του *SERPING1*. Μια περιοχή πλούσια σε GC μεταξύ των νουκλεοτιδίων -81 και -61 (81% περιεκτικότητα σε G-C) περιέχει το στοιχείο Sp-1 (Specificity protein 1) στην περιοχή -82 με -74 και 2 από τα 5 νουκλεοτίδια της περιοχής -62 με -58 στην οποία βρίσκεται το CAAT box<sup>15</sup>. Τα ρυθμιστικά στοιχεία Sp-1 και CAAT box δεν διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας του υποκινητή του *SERPING1*<sup>13</sup>.

### A.2.2 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΟΥ C1-INH

Με μελέτες ανοσοφθορισμού αποδείχθηκε ότι σημαντική πηγή C1-INH *in vivo* είναι τα παρεγχυματικά κύτταρα του ήπατος<sup>16</sup>. Μία ποικιλία άλλων τύπων κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των μονοκυττάρων περιφερικού αίματος, μικρογλοιακών κυττάρων<sup>17</sup>, ινοβλαστών<sup>18</sup>, και ενδοθηλιακών κυττάρων επίσης συνθέτουν και εκκρίνουν C1-INH τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*<sup>19</sup>. Επιμέρους πιθανές θέσεις σύνθεσης C1-INH είναι ο πλακούντας, οι πυραμιδοειδής νευρώνες, τα κύτταρα μικρογλοίας στον εγκέφαλο<sup>17</sup>, τα μεγακαρυοκύτταρα και αιμοπετάλια στα οποία αποθηκεύεται σε α-κόκκους<sup>20,21</sup>.

Η επαγωγή της σύνθεσης του C1-INH επηρεάζεται από κυτταροκίνες και ορμόνες. Αρχικά, πρέπει να αναφερθεί ότι η θεραπεία του κληρονομικού αγγειοιδήματος με δαναζόλη, το οποίο είναι ένα παράγωγο ανδρογόνων, αυξάνει τα επίπεδα της C1-INH<sup>22</sup>. Ο μηχανισμός με τον οποίο λειτουργούν τα ανδρογόνα δεν είναι γνωστός.

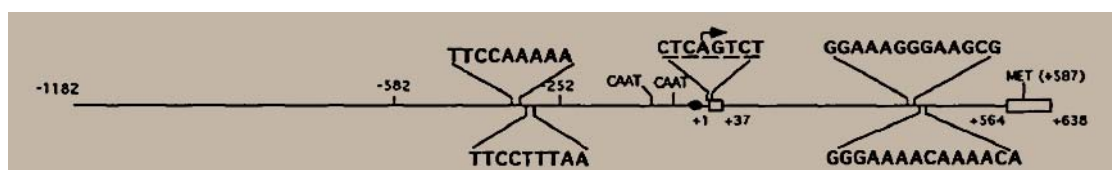
Η Ιντερφερόνη-γ (Interferon-γ, INF-γ) είναι μία κυτταροκίνη που ανήκει στις τύπου II ιντερφερόνες και αποτελεί τον πιο ικανό ρυθμιστή της σύνθεσης του C1-INH, αυξάνοντας τη σύνθεση του C1-INH. Αυξημένη παραγωγή του C1-INH με INF-γ έχει αποδειχθεί ότι είναι ανεξάρτητη από *de novo* πρωτεϊνική σύνθεση και οφείλεται κυρίως στην αύξηση του ρυθμού μεταγραφής του γονιδίου. Ωστόσο, η αυξημένη σταθερότητα του mRNA μπορεί επίσης να

συμβάλει στην αύξηση των επιπέδων του mRNA του C1-INH. Η αύξηση αυτή είναι πιο εμφανής στα μονοκύτταρα όπου η ημιζωή του C1-INH mRNA αυξήθηκε κατά 4 φορές από 1,5 σε 5,8 ώρες<sup>23</sup>. Στο γονίδιο του *SERPING1* ανακαλύφθηκαν 2 αλληλουχίες ενεργοποίησης της INF-γ (GAS) στη 5' ανοδική περιοχή (-346 με -338 και -332 με -324) και 2 πιθανά στοιχεία διεγερμένης απόκρισης INF (ISTREs) βρέθηκαν στο πρώτο ιντρόνιο (+373 με +386 και +392 με +405). Οι αλληλουχίες αυτές στις ιντρονικές περιοχές και στα ανοδικά τμήματα του γονιδίου του C1-INH εμπλέκονται στην INF-γ επαγωγή του γονιδίου C1-INH<sup>24</sup> (εικ.4).

Επιπρόσθετα, η Ιντερφερόνη-α (Interferon-α, INF-α), που παράγεται από τα λευκοκύτταρα και η ιντερφερόνη-β (Interferon-β, INF-β), η οποία παράγεται από τους ινοβλάστες ανήκουν στις ιντερφερόνες τύπου I. Οι δύο αυτές κατηγορίες ιντερφερονών ενισχύουν την παραγωγή της C1-INH σε μεγάλο αριθμό κυττάρων<sup>25</sup>.

Ο παράγοντας διέγερσης αποικίας μακροφάγων (Macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) είναι ένας γλυκοπρωτεϊνικός αυξητικός παράγοντας που ρυθμίζει ειδικά την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων. Επιπλέον συμμετέχει στο συντονισμό της ανάπτυξης του πλακούντα. Υποδοχείς για τον M-CSF υπάρχουν μόνο στην κυτταρική σειρά των μακροφάγων και είναι υποδοχείς τυροσίνης με δυνατότητα φωσφοριλίσωσης της ίδιας πρωτεΐνης και άλλων μεταγραφικών παραγόντων μετά την ενεργοποίησή του. Ο M-CSF έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει διάφορες λειτουργικές δραστηριότητες των ώριμων μονοκυττάρων/μακροφάγων, όπως τη μικροβιακή θανάτωση, τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα και τη σύνθεση των προϊόντων των μακροφάγων μετά από επαγωγή. Ο M-CSF ασκεί επίδραση στην απελευθέρωση του C1-INH στα μονοκύτταρα αυξάνοντας τα επίπεδα του. Η αύξηση των επιπέδων του C1-INH μπορεί να οφείλεται στην άμεση επίδραση του M-CSF, αλλά μπορεί να προκαλείται και από άλλες λεμφοκίνες οι οποίες επάγονται από τον M-CSF<sup>26</sup>.

Ο C1-INH είναι μία πρωτεΐνη οξείας φάσης, δηλαδή τα επίπεδα του mRNA του και τα επίπεδα στον ορό αυξάνονται σε απόκριση σε φλεγμονή. Ως αποτέλεσμα το γονίδιο *SERPING1* αποκρίνεται στην δράση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών<sup>15</sup>. Η ιντερλευκίνη-6 (Interleukin 6, IL-6) και η INF-γ ρυθμίζουν την ηπατική σύνθεση του C1-INH. Καθένας από αυτούς τους μεσολαβητές δρα προ-μεταφραστικά, και εμφανίζουν αθροιστικά αποτελέσματα όσον αφορά τη σύνθεση C1-INH όταν συνδυαστούν. Τέλος, η ιντερλευκίνη-1 (Interleukin 1, IL-1), η οποία από μόνη της δεν έχει ουσιαστικά καμία επίδραση, έχει σημαντική ανασταλτική ή διεγερτική επίδραση στην έκκριση του C1-INH όταν προστίθεται σε συνδυασμό είτε με IL-6 ή INF-γ, αντίστοιχα<sup>27,28</sup>.



**Εικόνα 4:** Σχηματική απεικόνιση της περιοχής του υποδοχέα του C1-INH και τα στοιχεία απόκρισης INF-γ. Το CAAT box είναι στη θέση -103 με -100 και -61 με -58. Η αλληλουχία του H DNA βρίσκεται στην περιοχή -48 με -17. Το στοιχείο έναρξης βρίσκεται στην θέση -3 με +5 που είναι υπογραμμισμένη. Το βέλος συμβολίζει το σημείο έναρξης της μεταγραφής (+1), και το πρώτο και δεύτερο εξόνιο είναι μέσα στα κουτιά. Οι αλληλουχίες GAS που παίρνουν μέρος στην απόκριση του INF-γ είναι στις -346 με -338 και -332 με -324. Οι ISREs είναι στο πρώτο ιντρόνιο στις περιοχές +373 με +386 και +392 με +405<sup>24</sup>.

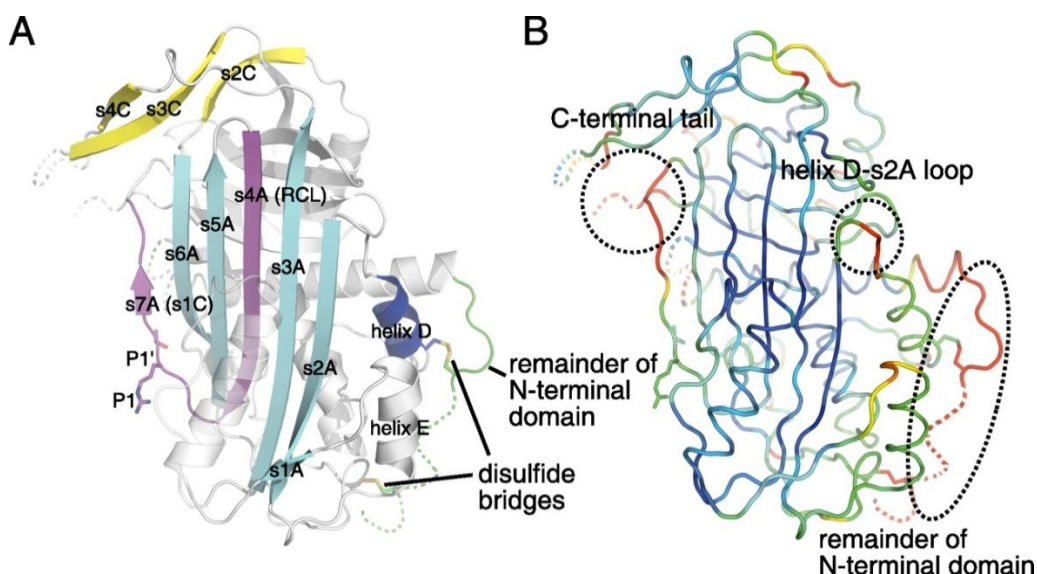
### A.2.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Ο C1-INH είναι μέλος μιας οικογένειας αναστολέων πρωτεάσης σερίνης. Αυτή η οικογένεια αποτελεί μια κατηγορία πρωτεϊνών διατηρημένη σε όλη την εξέλιξη και χαρακτηρίζεται από μια κοινή δομή. Η κύρια λειτουργία πολλών σερπινών είναι να ρυθμίζουν τη δραστηριότητα των πρωτεασών σερίνης.

Ο ώριμος C1-INH είναι μια πρωτεΐνη 478 αμινοξέων και είναι σε μεγάλο βαθμό γλυκοζυλιωμένη (περίπου 30% κατά βάρος)<sup>29</sup>. Το μοριακό του βάρος είναι 76 kDa<sup>30</sup>. Το μόριο περιέχει 13 θέσεις γλυκοζυλίωσης<sup>29</sup>. Ο C1-INH αποτελείται από ένα N-τερματικό πεδίο που αποτελείται από 113 αμινοξέα και μια περιοχή σερίνης με 365 αμινοξέα. Δύο δισουλφιδικές γέφυρες που συνδέουν την κυστεΐνη 101 με την κυστεΐνη 406 και την κυστεΐνη 108 με την κυστεΐνη 183, συνδέουν το N-τερματικό και το C-τερματικό τομέα. Η δομή του τομέα σερίνης είναι ομόλογη με εκείνη των άλλων σερπινών, και είναι απαραίτητη για την ανασταλτική ικανότητα του μορίου<sup>31</sup>. Σε σύγκριση με άλλες σερίνες πλάσματος, ο C1-INH είναι ένας ασθενής αναστολέας, αν και η ανασταλτική ικανότητα του C1-INH μπορεί να ενισχυθεί με γλυκοζαμινογλυκάνες.

Η γενικότερη δομή του C1-INH (εικ.5) μοιάζει με των υπόλοιπων σερπινών, δηλαδή αποτελείται από 3 β-φύλλα και 9 α-έλικες. Επιπρόσθετα, υπάρχει και ένας βρόγχος ενεργοποίησης (reactive centre loop, RCL), ο οποίος βρίσκεται έξω από το κεντρικό β-φύλλο και έχει τη δυνατότητα αλληλεπίδρασης με πρωτεάσες-στόχους. Τα κυριότερα κατάλοιπα που παίρνουν μέρος στην αλληλεπίδραση είναι τα P1 και P1', Arg444-Thr445, τα οποία βρίσκονται το ένα δίπλα στο άλλο και αποτελούν στόχο για τις πρωτεάσες<sup>31</sup>. Με την ομοιοπολική πρόσδεση της πρωτεάσης στον C1-INH γίνεται διάσπαση του δεσμού Arg444-Thr445 που ακολουθείται από διαμορφωτική αλλαγή και έχει ως αποτέλεσμα την μετατόπιση της πρωτεάσης επί του C1-INH προς την αντίθετη πλευρά του μορίου<sup>32</sup>.

Η σύγκριση της δομής του C1-INH με την δομή της αντιθρομβίνης III και του αναστολέα πρωτεάσης α1 δείχνει τη συνολική δομική ομοιότητα μεταξύ των σερπινών. Η κύρια δομική διαφορά μεταξύ των σερπινών είναι στο C-τερματικό μέρος του RCL όπου η C1-INH έχει το μεγαλύτερο β-φύλλο A μεταξύ των σερπινών με επτά σκέλη<sup>32</sup>.

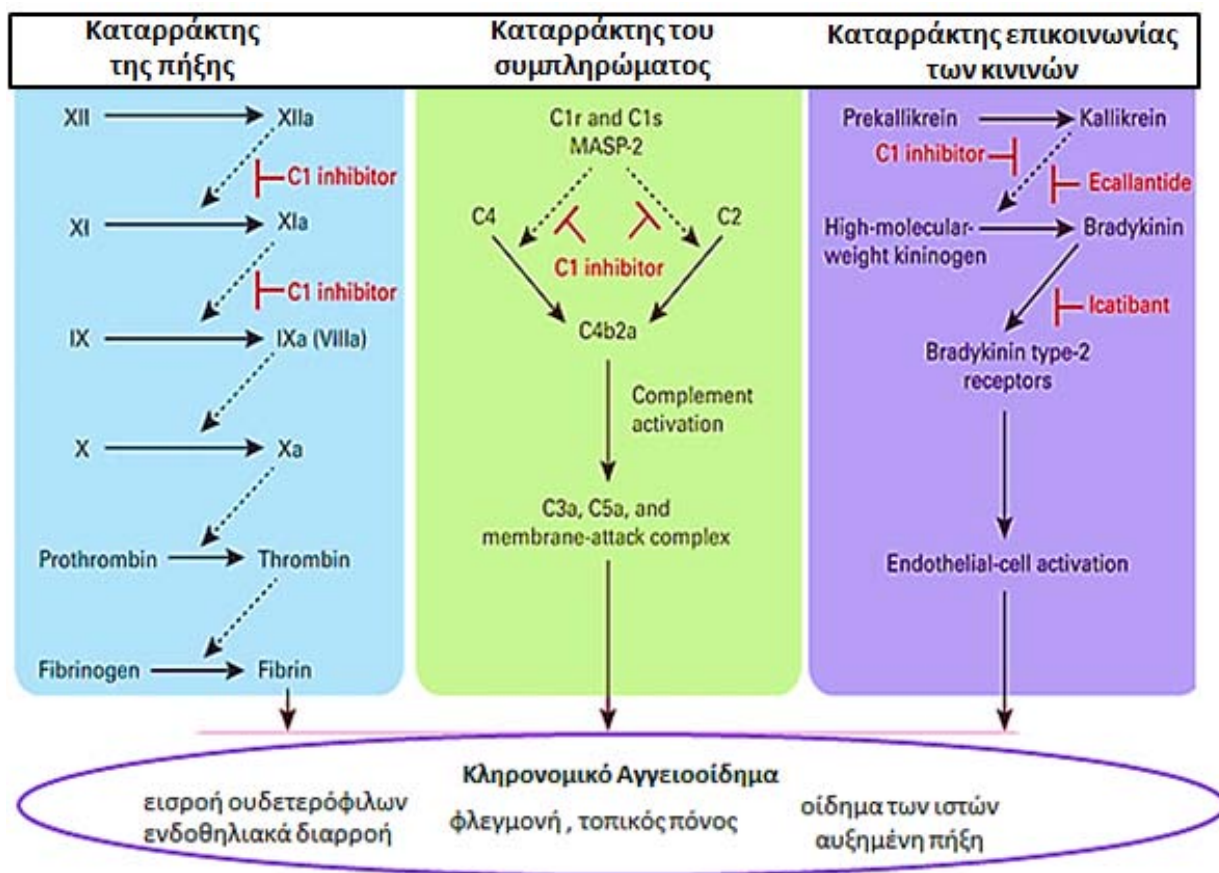


**Εικόνα 5:** Η συνολική δομή της περιοχής σερίνης του C1-INH. Ο C1-INH έχει το μεγαλύτερο β-φύλλο A μεταξύ των σερπινών με επτά έλικες<sup>32</sup>.



#### A.2.4 ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΧΕΙ Ο C1-INH

Ο C1-INH παίρνει μέρος στη ρύθμιση της ενεργοποίησης του συμπληρώματος, την ενδογενή πορεία πήξης και το σύστημα επικοινωνίας των κινινών (σχηματισμός βραδυκινίνης) (εικ.6).



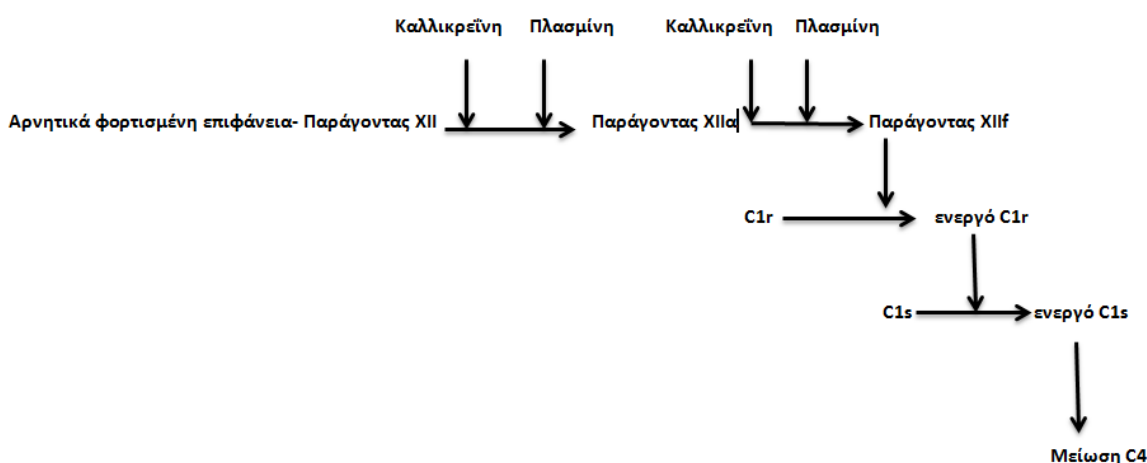
**Εικόνα 6:** Συνολική απεικόνιση των μονοπατιών στα οποία λαμβάνει μέρος ο C1-INH. Αρχικά, απεικονίζεται ο καταρράκτης της πήξης, στη συνέχεια ο καταρράκτης του συμπληρώματος και τέλος το σύστημα επικοινωνίας των κινινών<sup>3</sup>.

Το σύστημα του συμπληρώματος αποτελεί σημαντικό τμήμα του ανοσοποιητικού συστήματος που ενισχύει την ικανότητα των αντισωμάτων και των φαγοκυττάρων να αντιμετωπίσουν παθογόνους μικροοργανισμούς. Αποτελεί μέρος του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος. Σε αυτό το σύστημα ο C1-INH είναι ο μοναδικός ρυθμιστής του πρώτου μέρους της κλασσικής οδού του συμπληρώματος, απενεργοποιώντας τα συστατικά του C1, τα C1r και C1s, και αποσυνδέοντας την υπομονάδα C1q, ώστε να μη λαμβάνει χώρα άσκοπος πολλαπλασιασμός των πρωτεϊνών του συμπληρώματος. Με την απενεργοποίηση αυτών των συστατικών είναι αδύνατη η ενεργοποίηση των C2 και C4 πρωτεϊνών του συμπληρώματος από το C1s, με αποτέλεσμα τον έλεγχο της κλασσικής οδού του συμπληρώματος. Στο κληρονομικό αγγειοίδημα, ο C1-INH είναι μειωμένος ή απουσιάζει. Αυτό οδηγεί σε ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση του συμπληρώματος από την αρχή του καταρράκτη αυτού (C1, C2 και C4), πριν γίνει ενεργοποίηση άλλων αναστολέων (C4-δεσμευτική πρωτεΐνη και ο παράγοντας I) που μπορούν να διακόψουν το μονοπάτι με αποτέλεσμα τη συσσώρευση παραγόντων του συμπληρώματος (C4) και αυξημένη

σύνθεση αναφυλατοξινών (C3a, C5a) και χημειοταξινών (C3b) που διαιωνίζουν τη φλεγμονή, το τοπικό οίδημα του δέρματος και των σπλαγχνικών οργάνων, τον ασκίτη και τη μείωση ενδοαγγειακού όγκου<sup>2</sup>.

Επιπρόσθετα, ο C1-INH αποτελεί τον πιο σημαντικό αναστολέα ενεργοποίησης της πήξης του αίματος, έχοντας ένα κεντρικό ρόλο στην αδρανοποίηση των παραγόντων πήξης XIIa και του μεταβολίτη XII<sub>f</sub>. Επιπλέον, προκαλεί άμεση αναστολή της ενεργοποιημένης καλλικρεΐνης<sup>2</sup>.

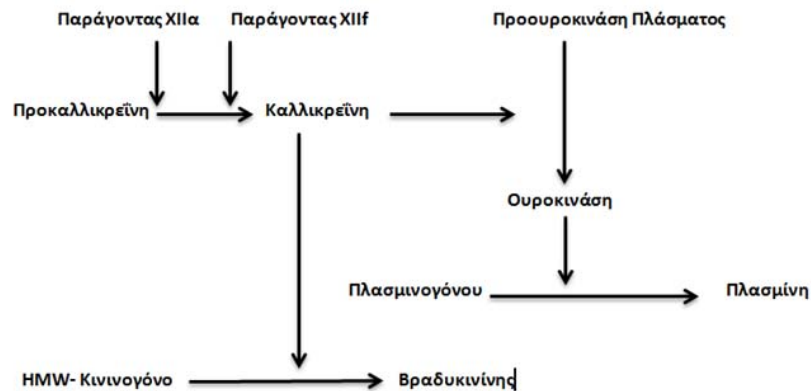
Αρχικά, στο μονοπάτι πήξης (εικ.7) του αίματος ο παράγοντας XII κυκλοφορεί ως προένζυμο χωρίς κάποια εμφανή δραστηριότητα, με δυνατότητα αυτοενεργοποίησης του μετά από σύνδεση με αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια και τη μετατροπή του σε ενεργό ένζυμο, τον παράγοντα XIIa. Αυτή η αντίδραση είναι σχετικά αργή. Ένα πολύ μικρό ποσοστό του παράγοντα XIIa είναι παρόν στο πλάσμα (λιγότερο από 0,01% της συνολικής περιεκτικότητας σε παράγοντα XII) και είναι απαραίτητο για τη λειτουργία του καταρράκτη. Θετικές ανατροφοδοτήσεις υπάρχουν από τα προϊόντα που προκύπτουν από την ενεργοποίηση του παράγοντα XII, δηλαδή η καλλικρεΐνη ή η πλασμίνη μετατρέπουν γρήγορα τον παράγοντα XII σε παράγοντα XIIa. Μια επιπλέον διάσπαση του παράγοντα XIIa τον μετατρέπει σε θραύσμα του παράγοντα XII (τον παράγοντα XII<sub>f</sub>), ο οποίος διατηρεί την ικανότητα να μετατρέπει προκαλλικρεΐνη σε καλλικρεΐνη, αλλά είναι αναποτελεσματικός στην ενδογενή πήξη, στην οποία ο παράγοντας XIIa μετατρέπει τον παράγοντα πήξης XI σε παράγοντα XIa. Παρόλα αυτά, ο παράγοντας XII<sub>f</sub> έχει την ικανότητα να ενεργοποιεί το επιμέρους συστατικό C1r του πρώτου συστατικού του συμπληρώματος και έτσι δίνεται μία σύνδεση μεταξύ του καταρράκτη σχηματισμού της βραδυκινίνης και του καταρράκτη του συμπληρώματος. Το ενεργό C1r μπορεί να μετατρέψει το C1s στην ενεργή του μορφή. Το ενεργό πλέον C1s μπορεί να ενεργοποιήσει τα C4 και C2<sup>33</sup>.



**Εικόνα 7:** Η αντίδραση που εξαρτάται από τον παράγοντα XII. Η έναρξη γίνεται με την αυτοενεργοποίηση του παράγοντα XII, διάσπαση του επιφανειακά δεσμευμένου παράγοντα XII από τον παράγοντα XIIa ακολουθούμενη από ενεργοποίηση με καλλικρεΐνη. Η πλασμίνη ενεργοποιεί τον παράγοντα XII παρομοίως, αλλά δεν μπορεί να συνεισφέρει σημαντικά εκτός αν η C1-INH του πλάσματος είναι ελλιπής. Ο παράγοντας XII<sub>f</sub> ενεργοποιεί το συμπλήρωμα.

Η προκαλλικρεΐνη μετατρέπεται σε καλλικρεΐνη είτε από τον παράγοντα XIIa είτε από τον παράγοντα XII<sub>f</sub>. Τα υποστρώματα καλλικρεΐνης περιλαμβάνουν υψηλού μοριακού βάρους κινινογόνο (HK), από το οποίο προέρχεται η βραδυκινίνη. Η καλλικρεΐνη ενεργοποιεί μία μικρή ποσότητα προ-ουροκινάσης που υπάρχει στο πλάσμα, και η ουροκινάση που παράγεται μετατρέπει το πλασμινογόνο σε πλασμίνη. Η καλλικρεΐνη διαθέτει την ικανότητα να μετατρέπει άμεσα το

πλασμινογόνου σε πλασμίνη, αλλά με μικρότερη αποτελεσματικότητα από την ουροκινάση<sup>33</sup> (εικ.8).



**Εικόνα 8:** Αντιδράσεις εξαρτημένες από καλλικρεΐνη για την παραγωγή βραδυκινίνης και αύξηση ινωδόλυσης.

Μια μείωση στη τιμή της C1-INH (όπως στη περίπτωση του κληρονομικού αγγειοιδήματος) οδηγεί σε αυξημένες ποσότητες XIIa και XIIIf. Ο παράγοντας XIIa ενεργοποιεί μόρια XII που ενεργοποιούν με τη σειρά τους επιπλέον μόρια XIIa, το οποίο οδηγεί σε μεγαλύτερη αύξηση του μορίου XIIa. Ο παράγοντας XIIa επίσης διασπά την προκαλλικρεΐνη στο δραστικό ένζυμο καλλικρεΐνη, το οποίο με τη σειρά του διασπά υψηλού μοριακού βάρους κινινογόνα στο πλάσμα, με αποτέλεσμα την υπερβολική απελευθέρωση βραδυκινίνης. Η βραδυκινίνη συνδέεται με κατάλληλου τύπου 2 υποδοχείς στα ενδοθηλιακά κύτταρα, προκαλώντας αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα (που οδηγεί σε οίδημα, πρήξιμο, και ασκίτη), αγγειοδιαστολή (που οδηγεί σε συμφόρηση, ερύθημα και υπόταση), και συστολή του μη αγγειακού λείου μυός (που οδηγεί σε κράμπες, σπασμούς και πόνο)<sup>2</sup>.

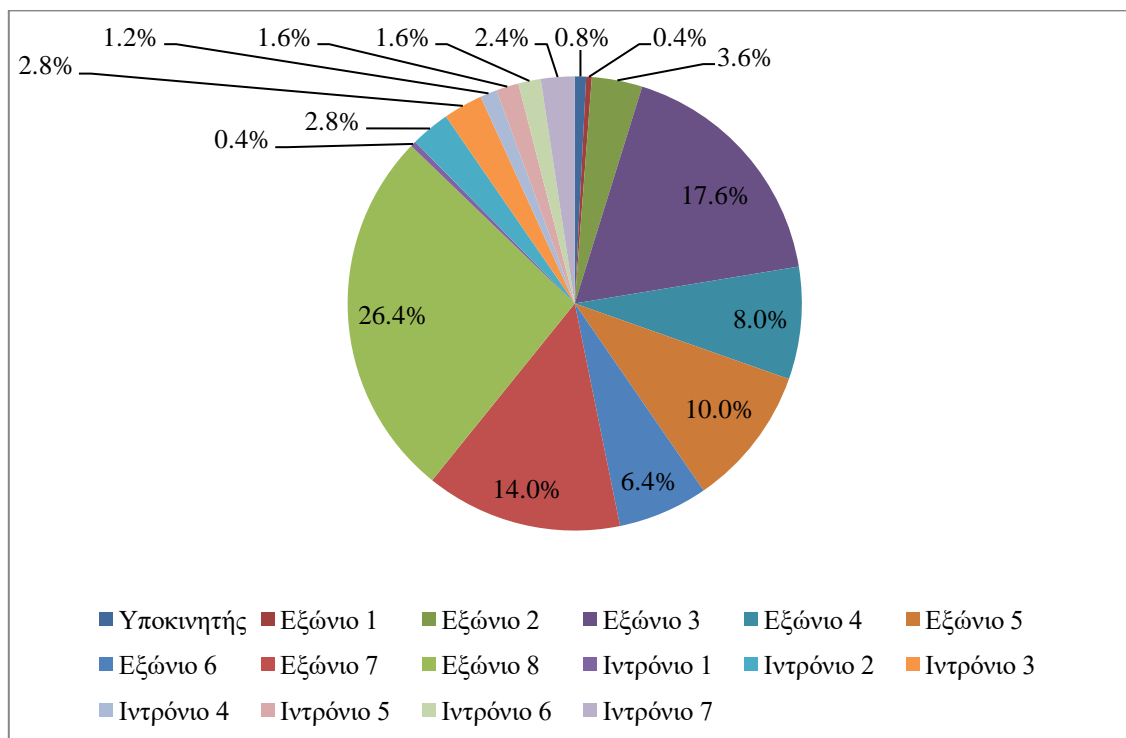
Μία άλλη οδός ενεργοποίησης της βραδυκινίνης χωρίς τη μεσολάβηση του παράγοντα XII, ενεργοποιεί το σύμπλοκο προκαλλικρεΐνη-HK απευθείας στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η προλυκαρβοξυπεπτιδάση και/ή πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90 (HSP-90) μετατρέπει την προκαλλικρεΐνη σε καλλικρεΐνη. Μόλις μία μικρή ποσότητα καλλικρεΐνης παραχθεί, η διάσπαση του παράγοντα XII από την καλλικρεΐνη θα ενεργοποιήσει το καταρράκτη σχηματισμού κινίνης.

### A.2.5 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *SERPING1*

Το γονίδιο *SERPING1* παρουσιάζει πάνω από 450 μεταλλάξεις που σχετίζονται με την εμφάνιση του κληρονομικού αγγειοιδήματος<sup>34</sup>. Οι μεταλλάξεις αυτές εμφανίζονται διάσπαρτες σε όλη την έκταση του γονιδίου. Το υψηλό ποσοστό μεταλλαξιγένεσης που εμφανίζει το συγκεκριμένο γονίδιο οφείλεται, εν μέρει, στη θέση του στο χρωμόσωμα καθώς βρίσκεται πολύ κοντά στο κεντρομερές. Οι κεντρομερικές περιοχές αποτελούν τις πιο ταχέως εξελισσόμενες περιοχές στο γονιδίωμα των ευκαριωτικών οργανισμών. Ένα ακόμα χαρακτηριστικό που καθιστά τη συχνότητα μεταλλαξιγένεσης του γονιδίου *SERPING1* υψηλή είναι ο μεγάλος αριθμός επαναλαμβανόμενων στοιχείων DNA. Τα 7 ιντρόνια του γονιδίου *SERPING1* περιέχουν 17 επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες  $Alu^1$  που αντιπροσωπεύουν «θερμά σημεία» για μη ομόλογο ανασυνδυασμό που μπορεί να προκαλέσει ελλείψεις ή διπλασιασμούς στο γονίδιο<sup>11</sup>. Οι μεγάλες ελλείψεις/διπλασιασμοί που προκαλούνται από τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες  $Alu$  συμβαίνουν σε όλο το γονίδιο. Αυτές οι βλάβες ευθύνονται για το 15-20% όλων των περιπτώσεων του κληρονομικού αγγειοιδήματος που οφείλεται σε μεταλλάξεις στον C1-INH<sup>1</sup>.

Ένα πρόσθετο δομικό χαρακτηριστικό που συμβάλλει στην υψηλή μεταλλαξιγένεση του γονιδίου *SERPING1* είναι η υψηλή συχνότητα CpG θέσεων. Οι CpG θέσεις αντιπροσωπεύουν θερμά σημεία για μεταλλάξεις καθώς είναι επιρρεπείς σε αυθόρμητη απαμίνωση. Το δινουκλεοτίδιο CpG στις δύο πρώτες θέσεις του κωδικονίου 466 που κωδικοποιεί τη κεντρική αργινίνη (CGC) του δραστικού κέντρου του C1-INH φαίνεται να είναι ένας συχνός στόχος για υποκαταστάσεις αμινοξέων<sup>35</sup>.

Όπως αναφέρθηκε, οι μεταλλάξεις που εμφανίζονται στο γονίδιο *SERPING1* είναι διάσπαρτες σε όλη την έκταση του γονιδίου. Το μεγαλύτερο ποσοστό μεταλλάξεων εμφανίζεται στο εξώνιο 8 που κωδικοποιεί το ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης (εικ.9). Οι μεταλλάξεις που εμφανίζονται στο γονίδιο ποικίλουν ως προς το είδος τους, ενώ οι περισσότερες είναι επιβλαβείς μεταλλάξεις (πιν.1).



Εικόνα 9: Ποσοστιαία απεικόνιση των μεταλλάξεων στις διαφορετικές περιοχές του γονιδίου *SERPING1*<sup>36</sup>.



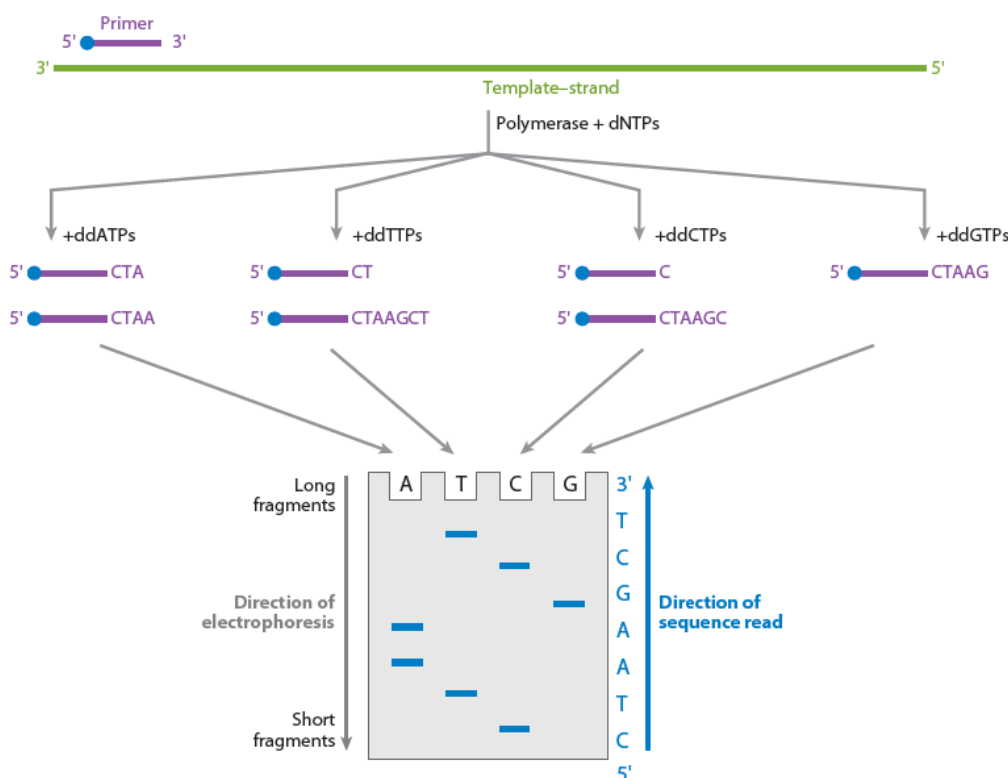
Είδος μετάλλαξης	Συχνότητα
Επιβλαβείς μεταλλάξεις (Missense mutations)	34.2%
Ουδέτερες μεταλλάξεις (Nonsense mutations)	7.1%
Αλλαγή πλαισίου ανάγνωσης (Frameshift alterations)	31.2%
Μεταλλάξεις στις θέσεις που επηρεάζουν τις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις (Splice-site defects)	9.4%
Μεταλλάξεις στις ρυθμιστικές περιοχές (Regulatory mutations)	1.1%
Μεγάλες γονιδιακές αναδιατάξεις (ελλείψεις ή προσθήκες)	17.0%

**Πίνακας 1:** Οι τύποι των μεταλλάξεων του γονιδίου *SERPINC1*<sup>37</sup>.

### A.3 ΜΕΘΟΔΟΣ SANGER

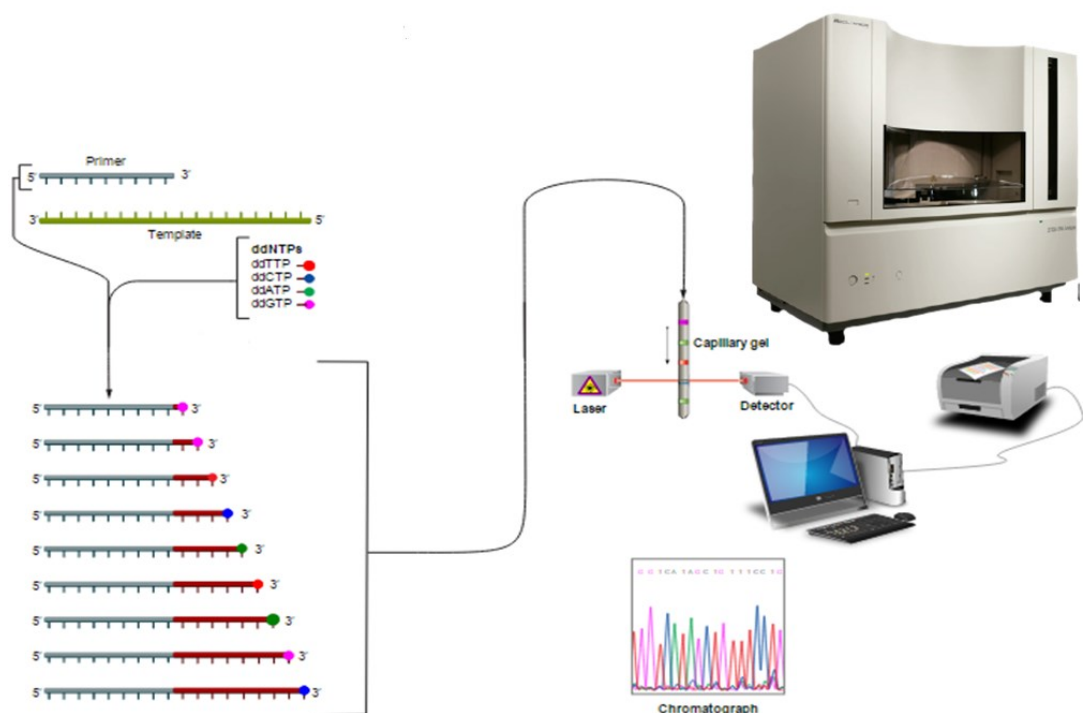
Η μέθοδος Sanger είναι μια μέθοδος προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA που βασίζεται στην τυχαία ενσωμάτωση τερματικών διδεοξυριβονουκλεοτιδίων (ddNTPs) από την DNA πολυμεράση κατά την *in vitro* αντιγραφή του DNA. Ανακαλύφθηκε από τον Frederick Sanger το 1977<sup>38</sup> και ήταν για αρκετές δεκαετίες η επικρατέστερη μέθοδος αλληλούχησης. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη χρήση των ddNTPs, τα οποία είναι τροποποιημένα dNTPs που στο 3' άκρο τους έχει αντικατασταθεί το υδροξύλιο με υδρογόνο και αυτό οδηγεί στην αδυναμία σχηματισμού φωσφοδιεστερικού δεσμού με το επόμενο dNTP κατά τη σύνθεση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Επομένως, όταν προστίθεται ένα ddNTP διακόπτεται η σύνθεση της αλυσίδας του DNA. Ως αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας παράγονται όλα τα πιθανά μεγέθη του αρχικού προϊόντος.

Παλαιότερα, λόγω ότι τα ddNTPs ήταν σημασμένα με ραδιενέργεια, η Sanger πραγματοποιούνταν σε τέσσερις αντιδράσεις. Πιο συγκεκριμένα, η σήμανση γινόταν αρχικά με <sup>32</sup>P και έπειτα σε μία προσπάθεια βελτίωσης της μεθόδου αντικαταστάθηκε με <sup>35</sup>S (η οποία έδινε πιο έντονες ζώνες)<sup>39</sup>. Στη συνέχεια, τα θραύσματα DNA που προέκυπταν από τις τέσσερις αντιδράσεις έτρεχαν σε πήκτωμα πολυακρίλαμιδίου. Οι ζώνες του DNA μπορούσαν να παρατηρηθούν με αυτοραδιογραφία ή υπεριώδη ακτινοβολία. Κάθε ζώνη συμβολίζει ένα τμήμα DNA που είναι το αποτέλεσμα του τερματισμού σύνθεσης μίας αλυσίδας μετά τη προσθήκη ενός ddNTP. Τα τμήματα διαφορετικού μεγέθους βρίσκονται σε διαφορετικό ύψος, δηλαδή τα πιο μεγάλα τμήματα στα οποία έχουν προστεθεί και περισσότερα dNTPs βρίσκονται ψηλότερα στο πήκτωμα από ότι τα μικρότερα (εικ.10). Επομένως, αποκαλύπτεται η θέση της κάθε βάσης<sup>39</sup>.

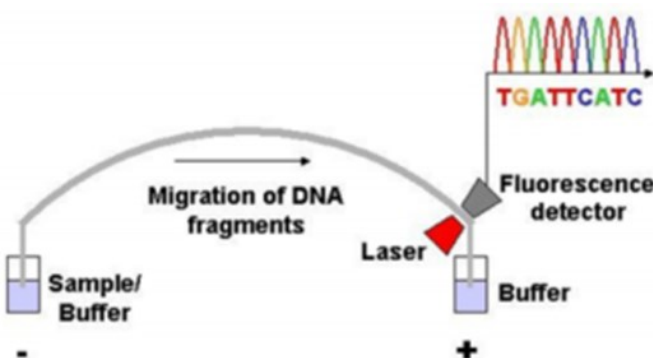


Εικόνα 10: Η μέθοδος Sanger<sup>39</sup>.

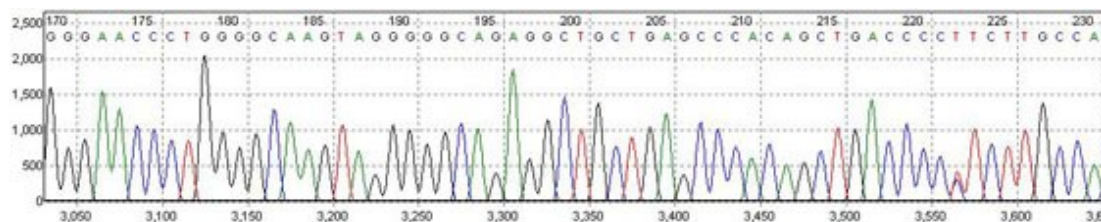
Μία σημαντική εξέλιξη στη μέθοδο ήταν η αντικατάσταση των ραδιοσημασμένων ddNTPs με φθορίζοντα μόρια, με αποτέλεσμα να μην είναι αναγκαίο να λαμβάνουν χώρα τέσσερις αντιδράσεις αλλά μία, που περιέχει και τα τέσσερα ddNTPs, τα οποία είναι σημασμένα με διαφορετική φθορίζουσα χρωστική το καθένα (εικ.11). Με την αυτοματοποίηση της μεθόδου με τη χρήση γενετικών αναλυτών, γίνεται διαχωρισμός των διαφορετικών τμημάτων DNA με βάση το μέγεθος τους με τη χρήση της ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδή. Καθώς τα τμήματα DNA περνούν από τα τριχοειδή διεγείρεται η φθορίζουσα χρωστική με την οποία είναι σημασμένα τα ddNTPs και επειδή το μήκος κύματος της κάθε μίας διαφέρει μπορούν να διαχωριστούν<sup>40</sup> (εικ.12). Το αποτέλεσμα που προκύπτει είναι ένα χρωματογράφημα όπου κάθε διαφορετική κορυφή αντιστοιχεί σε διαφορετική φθορίζουσα χρωστική και άρα διαφορετική βάση στη συγκεκριμένη θέση<sup>41</sup> (εικ.13).



**Εικόνα 11:** Η μέθοδος Sanger.



**Εικόνα 12:** Η ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδή.



**Εικόνα 13:** Χαρακτηριστική εικόνα χρωματογραφήματος.

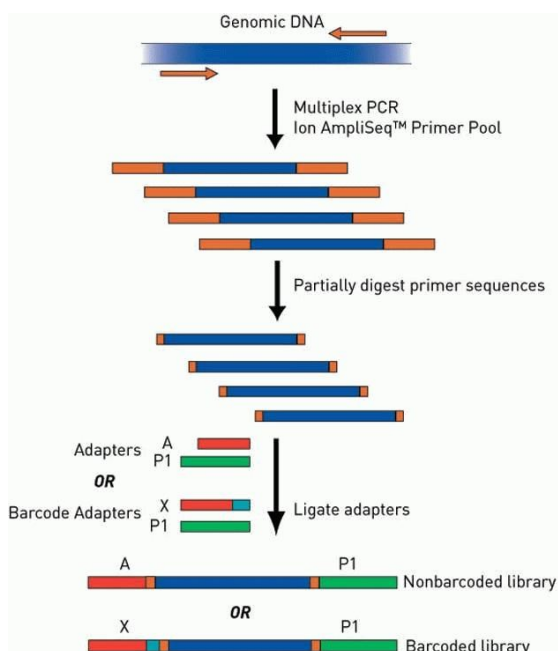
Η Sanger είναι μία μέθοδος με την οποία δίνεται η δυνατότητα να γίνει αλληλούχηση μικρών κομματιών DNA (περίπου 1000bp). Για ταυτόχρονη αλληλούχηση μεγαλύτερων τμημάτων DNA η μέθοδος αυτή δεν ενδείκνυται καθώς είναι μία διαδικασία χρονοβόρα και με μεγάλο κόστος. Για αυτό το λόγο η τεχνολογία οδηγήθηκε στην ανάπτυξη νέων μεθόδων αλληλούχησης DNA, τη λεγόμενη Αλληλούχηση Νέας Γενιάς (Next generation sequencing, NGS). Με το NGS δίνεται η δυνατότητα να λαμβάνουν χώρα πολλές αντιδράσεις ταυτόχρονα, κάτι που δεν είναι εφικτό με την Sanger, όπου μπορούν να λάβουν χώρα ταυτόχρονα μέχρι 384 αντιδράσεις.

## A.4 ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΝΕΑΣ ΓΕΝΙΑΣ (NGS)

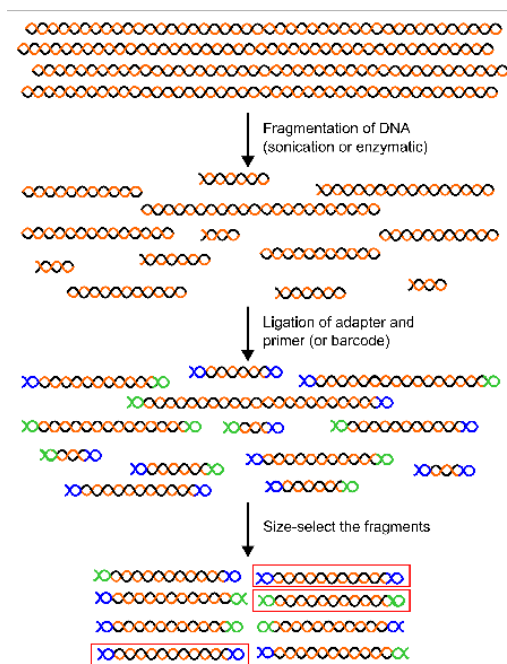
Παρά της διαρκείας βελτιώσεις στη μέθοδο της Sanger, οι περιορισμοί της μεθόδου συνέχισαν να υπάρχουν και αυτό οδήγησε στην ανάπτυξη νέων τεχνολογιών. Η τεχνολογία του NGS αναπτύχθηκε για να λαμβάνουν χώρα περισσότερες αντιδράσεις ταυτόχρονα, μεγαλύτερων τμημάτων DNA σε μικρότερο χρονικό διάστημα και με μεγαλύτερη ταχύτητα<sup>42</sup>. Λόγω της ευρείας αποδοχής της καινούριας αυτής τεχνολογίας πολλές εταιρείες ανέπτυξαν διαφορετικές πλατφόρμες του NGS.

Η πρώτη τεχνολογία NGS κυκλοφόρησε το 2005, ήταν η μέθοδος της πυροαλληλούχησης από τη 454 Life Sciences. Ένα χρόνο αργότερα, κάνει την εμφάνιση της η Solexa / Illumina. Το 2007 κυκλοφόρησε η τρίτη πλατφόρμα NGS, αυτή της SOLID από την Applied Biosystems. Τέλος, το 2010 η Ion Torrent κυκλοφόρησε το PGM. Αυτό το σύστημα αναπτύχθηκε από τον Jonathan Rothberg, ο οποίος είχε αναπτύξει και το σύστημα 454<sup>43</sup>.

Η διαδικασία του NGS ξεκινάει με την προετοιμασία της βιβλιοθήκης, η οποία μπορεί να γίνει με δύο τρόπους: με multiplex PCR, όπου χρησιμοποιούνται ομάδες εκκινητών (primer pools) που πολλαπλασιάζουν ταυτόχρονα τα πολλά διαφορετικά τμήματα DNA τα οποία θα αλληλουχηθούν (εικ.14) και με τυχαία θραυσματοποίηση του DNA (εικ.15). Στη συνέχεια, και στις δύο περιπτώσεις γίνεται *in vitro* πρόσδεση αλληλουχίας προσαρμογέα (adaptor) στα δύο άκρα κάθε πολλαπλασιασμένου τμήματος DNA καθώς και η προσθήκη του κωδικού ιχνηλασιμότητας (barcode). Ο προσαρμογέας είναι μία γνωστή αλληλουχία DNA. Ο κωδικός ιχνηλασιμότητας είναι μία αλληλουχία διαφορετική για κάθε δείγμα και βοηθάει στο διαχωρισμό τους. Πρέπει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση της δημιουργίας βιβλιοθήκης με τη χρήση PCR είναι απαραίτητο να κοπούν οι αλληλουχίες των εκκινητών για να προσδεθούν οι αλληλουχίες προσαρμογείς και οι κωδικοί ιχνηλασιμότητας. Με το τέλος της διαδικασίας αυτής κάθε αλληλουχία DNA που έχει παραχθεί είναι συνδεδεμένη με αλληλουχία προσαρμογέα και έναν κωδικό ιχνηλασιμότητας (εικ.16).



**Εικόνα 14:** Προετοιμασία της βιβλιοθήκης με *multiplex PCR* με χρήση ομάδων εκκινητών (primer pools) που πολλαπλασιάζουν τα τμήματα DNA τα οποία θα αλληλουχηθούν. Στη συνέχεια, κόβονται οι αλληλουχίες των εκκινητών ώστε να προσδεθούν οι αλληλουχίες προσαρμογείς και οι κωδικοί ιχνηλασιμότητας.<sup>44</sup>



**Εικόνα 15:** Προετοιμασία της βιβλιοθήκης με τυχαία θραυσματοποίηση του DNA και *in vitro* πρόσδεση αλληλουχίας προσαρμογέα και παράγοντα ιχνηλασιμότητας.



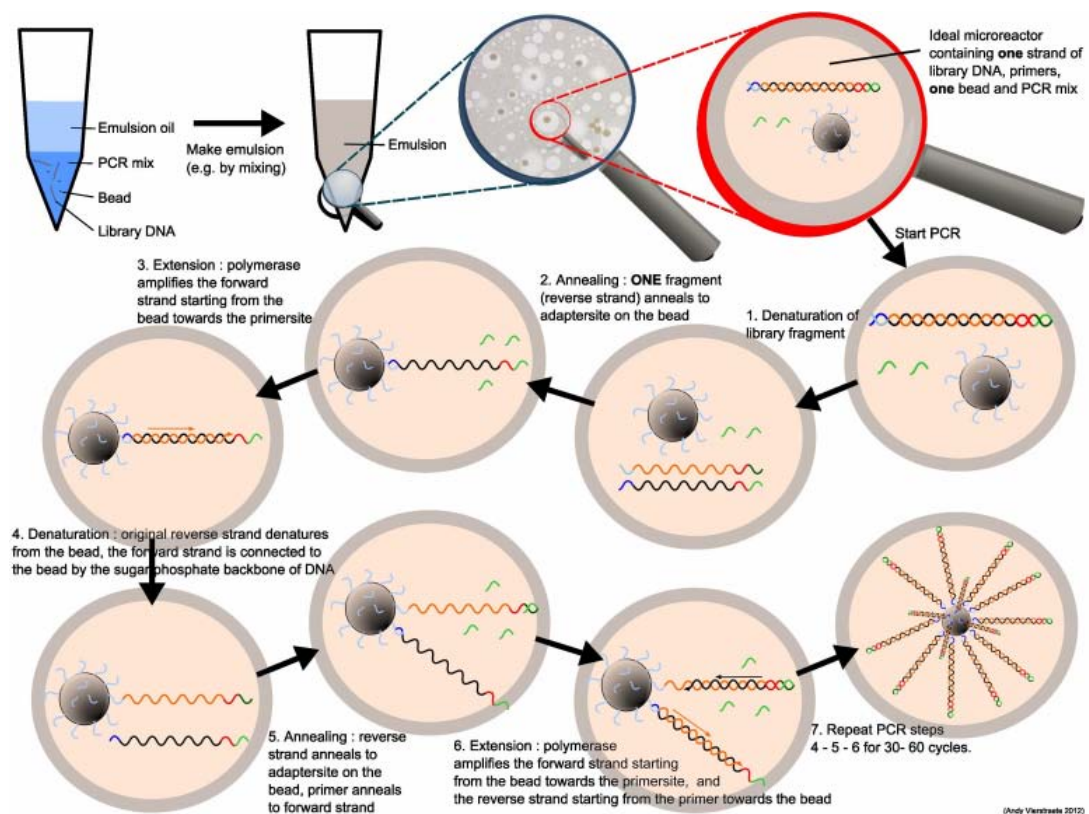
**Εικόνα 16:** Κάθε αλληλουχία DNA που έχει παραχθεί είναι συνδεδεμένη με την αλληλουχία προσαρμογέα και έναν κωδικό ιχνηλασιμότητας.

Στη συνέχεια, λαμβάνει χώρα η ενίσχυση των βιβλιοθηκών DNA, που μπορεί να επιτευχθεί είτε με PCR σε γαλάκτωμα (Emulsion PCR) είτε με PCR γέφυρας (Bridge PCR). Το κοινό στοιχείο στις δύο αυτές μεθόδους είναι ότι τα PCR προϊόντα που προέρχονται από ένα οποιαδήποτε μόριο βιβλιοθήκης καταλήγουν χωρικά συγκεντρωμένα, είτε σε ένα επίπεδο υπόστρωμα (PCR γέφυρας), είτε στην επιφάνεια σφαιριδίων (PCR σε γαλάκτωμα)<sup>45</sup>. Πιο αναλυτικά, για να λάβει χώρα η διαδικασία της PCR σε γαλάκτωμα πρέπει να γίνει αποδιάταξη των τμημάτων DNA της βιβλιοθήκης. Με το κατάλληλο διάλυμα που περιέχει όλα τα συστατικά για την PCR, εκκινητή δεσμευμένο με τα σφαιρίδια και τις βιβλιοθήκες αναδεύονται μαζί με έλαιο για να δημιουργηθούν μικρογαλακτώματα. Τα μικρογαλακτώματα περιέχουν κατά μέσο όρο ένα μόριο DNA και ένα σφαιρίδιο. Υπάρχουν επίσης κενά σφαιρίδια και σφαιρίδια με περισσότερα από ένα τμήματα DNA. Τα μικρογαλακτώματα ακολουθούν έναν επαναλαμβανόμενο κύκλο με διαφορετικές θερμοκρασίες όπως συμβαίνει σε μία συμβατική PCR. Σε κάθε κύκλο γίνεται σύνθεση DNA, αποδιάταξη των νέων δίκλωνων τμημάτων, και πρόσδεση στα ίδια σφαιρίδια των μονόκλωνων πλέον τμημάτων ώστε να συνεχίσει η σύνθεση DNA (εικ.17)<sup>46</sup>.

Στη PCR γέφυρας τα τμήματα DNA τοποθετούνται σε επίπεδο υπόστρωμα στο οποίο υπάρχουν PCR-εκκινητές συμπληρωματικοί προς τους προσαρμογείς που βρίσκονται στα άκρα

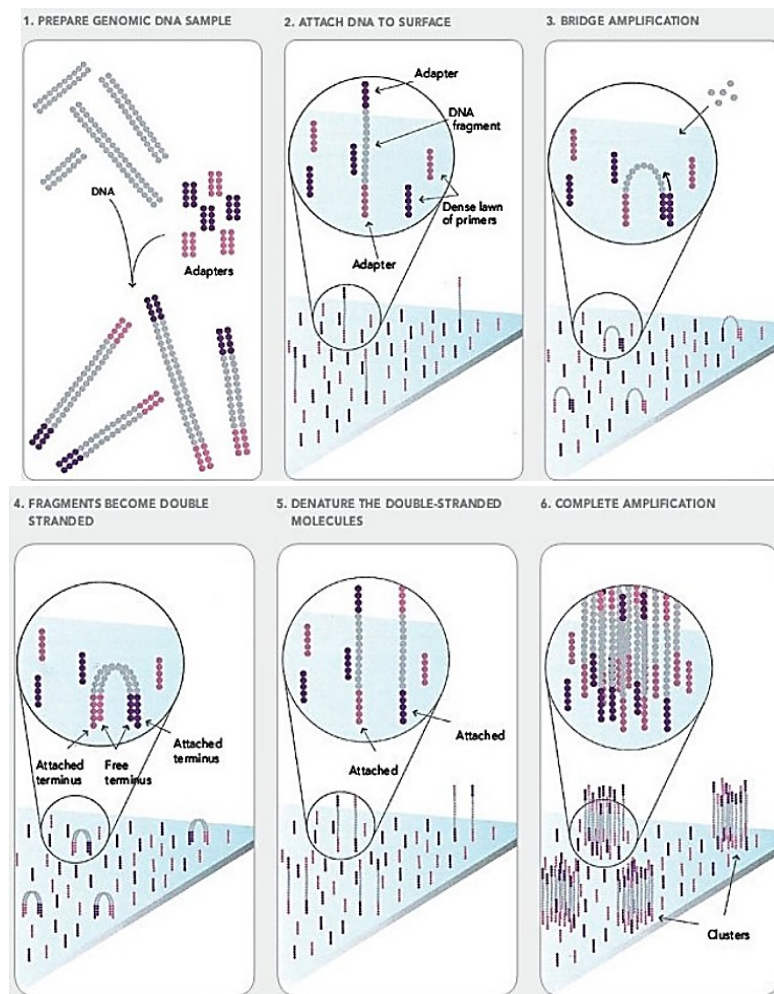
των τμημάτων DNA. Όλα τα μόρια που προκύπτουν από οποιοδήποτε μεμονωμένο πρότυπο κατά τη διάρκεια της ενίσχυσης παραμένουν ακινητοποιημένα και συγκεντρωμένα σε μια ενιαία φυσική θέση επί μίας συστοιχίας. Μετά την σύνδεση, λαμβάνουν χώρα εναλλασσόμενοι κύκλοι επέκτασης με πολυμεράση και αποδιάταξης με τη χρήση κατάλληλης χημικής ουσίας. Οι συστάδες που προκύπτουν ενισχύονται σε διακριτές θέσεις σε κάθε μία από τις οκτώ ανεξάρτητες λωρίδες του υποστρώματος (εικ.18)<sup>47,48</sup>.

Η διαδικασία προσδιορισμού αλληλουχίας συνίσταται από εναλλασσόμενους κύκλους λειτουργίας ενός ενζύμου (που μπορεί να είναι πολυμεράση ή λιγάση) και απόκτησης δεδομένων απεικόνισης. Τελευταίο βήμα αποτελεί η ανάλυση των δεδομένων που αποκτήθηκαν και η επεξεργασία τους με διάφορους αλγορίθμους που έχουν αναπτυχθεί.



Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση της PCR σε γαλάκτωμα.





**Εικόνα 18:** Σχηματική απεικόνιση της PCR γέφυρας.

Στη συνέχεια, θα αναφερθούν οι βασικότερες πλατφόρμες στον τομέα του NGS.

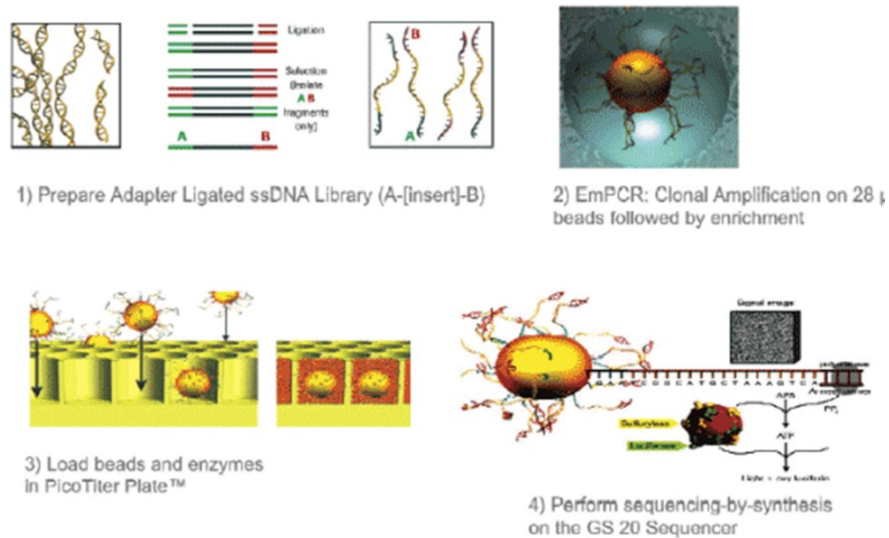
#### **A.4.1 454 ΣΥΣΤΗΜΑ/ ROCHE**

Το 454 σύστημα δημιουργήθηκε από τη Roche και χρησιμοποιεί την τεχνική της πυροαλληλούχησης<sup>49</sup>. Η ροή εργασιών της πλατφόρμας ξεκινάει με τη δημιουργία της βιβλιοθήκης, η οποία γίνεται είτε με θραυσματοποίηση του DNA σε μικρότερα τμήματα είτε με πολλαπλασιασμό των τμημάτων με τη multiplex PCR. Τα τμήματα DNA που δημιουργούνται και με τις δύο αυτές μεθόδους τελικά περιβάλλονται από αλληλουχίες προσαρμογείς. Οι προσαρμογείς παίζουν ρόλο τόσο στην ενίσχυση της βιβλιοθήκης όσο και στην αλληλούχηση. Η ενίσχυση της βιβλιοθήκης γίνεται με PCR σε γαλάκτωμα.

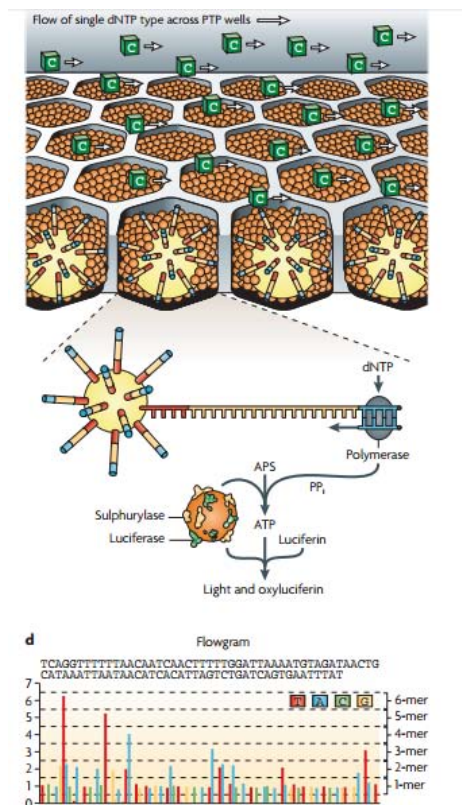
Η τεχνική της πυροαλληλούχησης βασίζεται στην ανίχνευση μορίων πυροφωσφορικού που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του DNA. Αυτό επιτρέπει την παραγωγή φωτός, το οποίο ανιχνεύεται από αισθητήρα. Τα σφαιρίδια με τις βιβλιοθήκες εισέρχονται στο πιάτο αλληλούχησης (σε κάθε φρεάτιο εισέρχεται μόνο ένα σφαιρίδιο) και προστίθεται DNA πολυμεράση και εκκινητές. Μικρότερα σφαιρίδια προστίθενται επίσης, που φέρουν ακινητοποιημένα ένζυμα απαραίτητα για τη πυροαλληλούχηση (τη σουλφουρυλάση ATP και τη λουσιφεράση). Προστίθενται διαδοχικά τα νουκλεοτίδια, ένα είδος κάθε φορά. Κάθε φορά που συνδέεται ένα νουκλεοτίδιο παράγεται φως που συλλαμβάνεται από τη κάμερα. Αυτή η τεχνική



βασίζεται στην αλληλούχηση μέσω σύνθεσης<sup>50</sup>. Η ένταση του φωτός αντιστοιχεί στον αριθμό των νουκλεοτιδίων ίδιου τύπου που έχουν ενσωματωθεί (εικ.19, εικ.20).



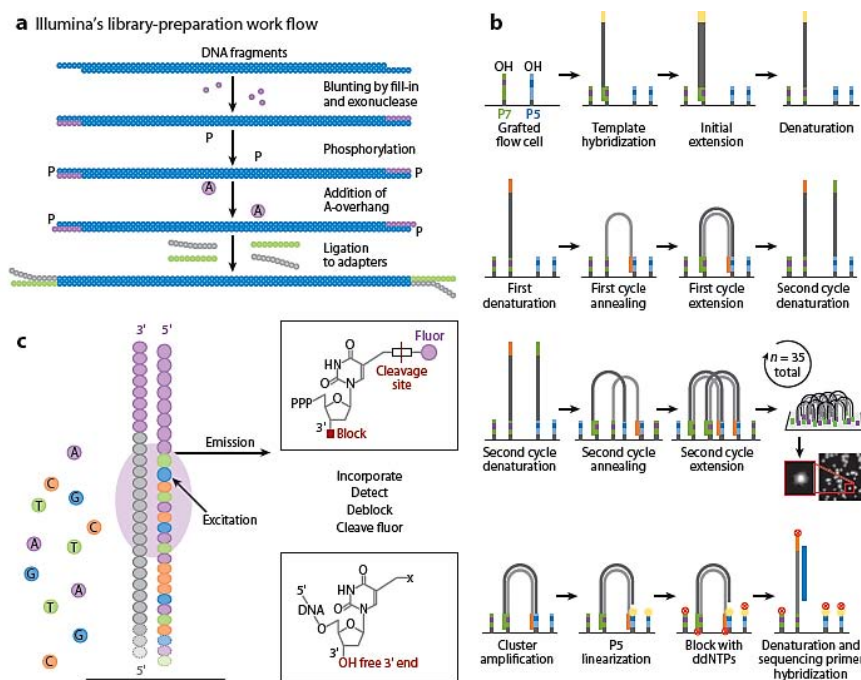
**Εικόνα 19:** Η διαδικασία της αλληλούχησης του DNA με την πλατφόρμα 454/Roche.



**Εικόνα 20:** Πυροαλληλούχηση με τη χρήση της πλατφόρμας Roche / 454. Μετά τη φόρτωση των ενισχυμένων σφαιριδίων σε μεμονωμένα PicoTiterPlate (PTP) φρεάτια, επιπλέον σφαιρίδια που περιέχουν σουλφουρυλάση και λουσιφεράση προστίθενται. Σε αυτό το παράδειγμα, ένα μόνο είδος δεοξυριβονουκλεοτιδίου προστίθεται, το dNTP και εμφανίζεται να ρέει στα φρεάτια PTP. Υπάρχει μία υψηλής ανάλυσης κάμερα που επιτρέπει την ανίχνευση του φωτός που παράγεται από κάθε φρεάτιο καθώς προχωράει η πυροαλληλούχηση. Τέλος, το φως που παράγεται καταγράφεται ως μια σειρά κορυφών.

## A.4.2 ILLUMINA

Η Illumina είναι μία πλατφόρμα που ανακαλύφθηκε από S.Balasubramanian και D.Klennerman. Αρχικό βήμα της μεθόδου αποτελεί η δημιουργία βιβλιοθήκης. Οι βιβλιοθήκες μπορούν να κατασκευαστούν με τους δύο τρόπους που αναφέρθηκαν με μόνο σκοπό τη δημιουργία μείγματος από τμήματα DNA πλασσωμένα με προσαρμογείς. Η ενίσχυση της βιβλιοθήκης σε αυτή τη πλατφόρμα γίνεται με PCR γέφυρας<sup>47 48</sup>. Στη συνέχεια, ακολουθεί η αλληλούχηση, στην οποία οι εκκινητές συνδέονται στα τμήματα DNA και προστίθενται νουκλεοτίδια σημασμένα με φθορίζουσες ουσίες. Για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας, τα τέσσερα είδη αναστρέψιμων βάσεων τερματισμού προστίθενται και τα μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια απομακρύνονται. Μια κάμερα λαμβάνει εικόνες των με φθορισμό σημασμένων νουκλεοτιδίων. Στη συνέχεια, η φθορίζουσα χρωστική, μαζί με τον τερματικό 3' αναστολέα αφαιρείται χημικά από το DNA, επιτρέποντας στον επόμενο κύκλο να αρχίσει<sup>51</sup>. Σε κάθε γύρο προστίθεται μόνο ένα είδος dNTP. Οι διαφορετικές βάσεις είναι σημασμένες με φθορίζουσες χρωστικές που εκπέμπουν σε διαφορετικό μήκος κύματος. Αυτό το είδος αλληλούχησης ονομάζεται αλληλούχηση με σύνθεση. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων είναι αναγκαίο να γίνει στοίχιση των διαφορετικών τμημάτων και σύγκριση με πρότυπη αλληλουχία<sup>52</sup>(εικ.21).

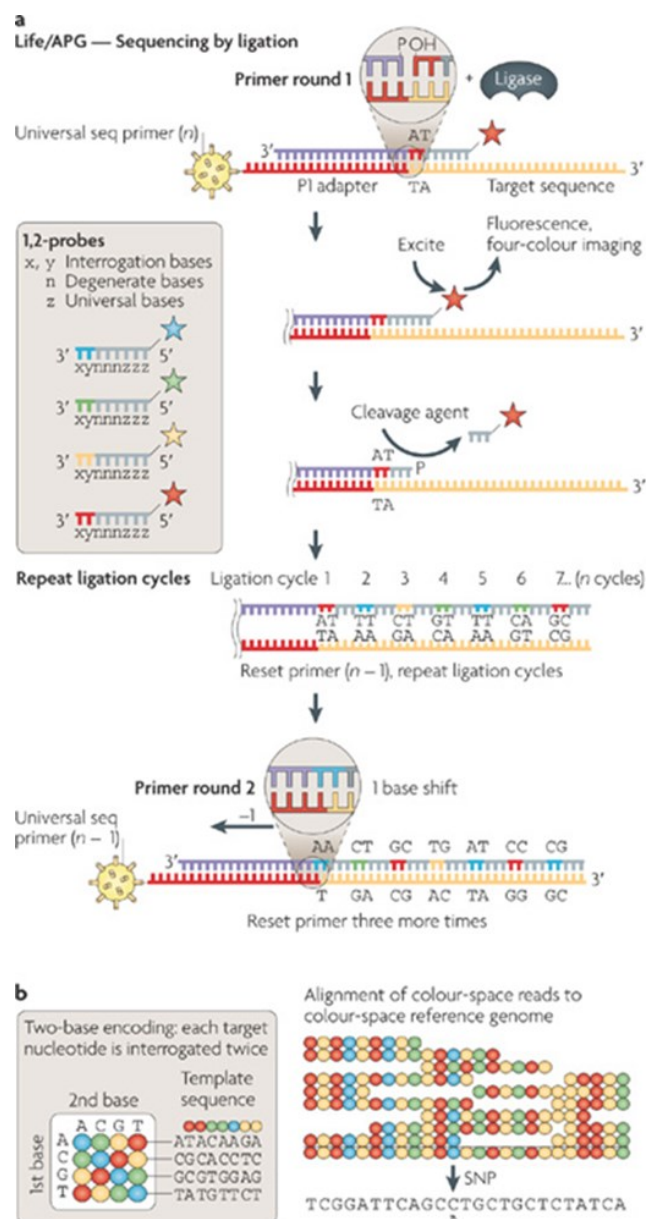


**Εικόνα 21:** Η Illumina (Α) Διαδικασία κατασκευής βιβλιοθήκης. (Β) Η PCR γέφυρας. (C) Ο προσδιορισμός αλληλουχίας με σύνθεση.

## A.4.3 SOLID

Η Solid είναι μία μέθοδος αλληλούχησης η οποία αναπτύχθηκε από την Applied Biosystems. Οι βιβλιοθήκες μπορούν να δημιουργηθούν με έναν από τους δύο τρόπους που αναφέρθηκαν. Η ενίσχυση της βιβλιοθήκης λαμβάνει χώρα με PCR σε γαλάκτωμα<sup>46</sup>. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας γίνεται με πρόσδεση και οδηγείται από μία DNA λιγάση. Γίνεται χρήση οκταμερών ολιγονουκλεοτιδίων που έχουν εκφυλισμένες βάσεις στις θέσεις 3-8(N) και ένα από τα 16 συγκεκριμένα δινουκλεοτίδια στις θέσεις 1-2. Οι θέσεις 6-8 που αποτελούνται από

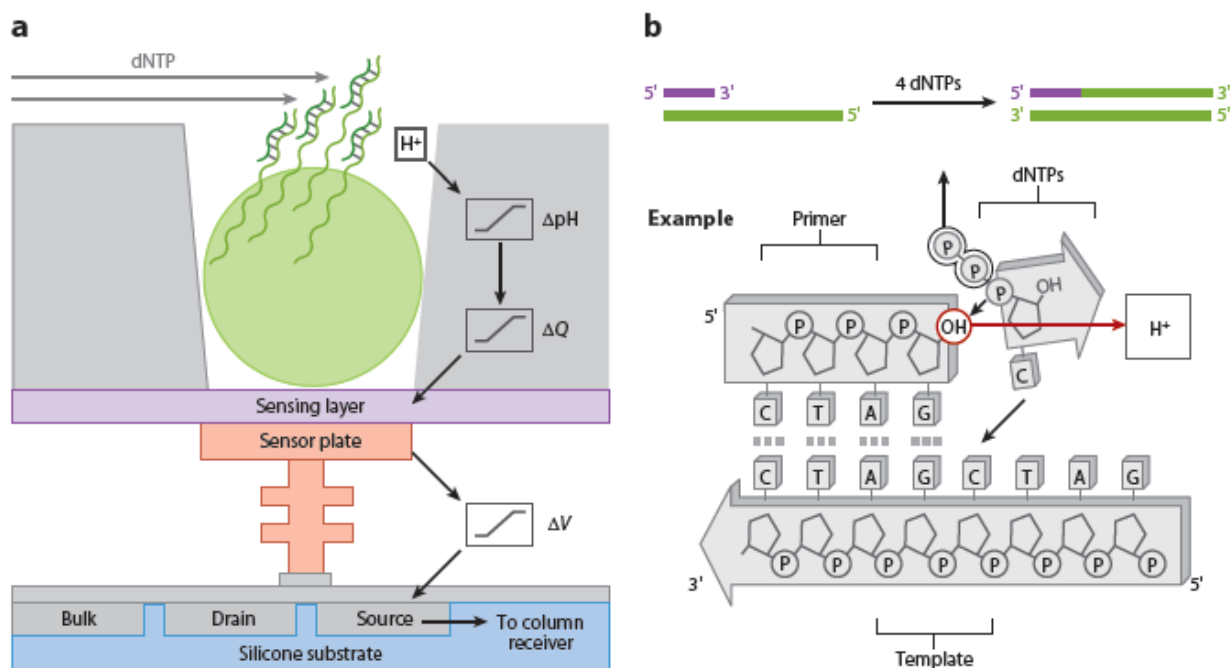
εκφυλισμένες βάσεις συνδέονται με μία από τις τέσσερις φθορίζουσες ουσίες. Η αλληλούχηση με πρόσδεση περιλαμβάνει: έναν εκκινητή συμπληρωματικό προς την αλληλουχία προσαρμογέα που υβριδοποιείται στο σύμπλεγμα μορίων-σφαιριδίων. Σε κάθε κύκλο αλληλούχησης γίνεται προσθήκη ενός πληθυσμού σημασμένων με φθορισμό οκταμερών που έχουν συμπληρωματικές βάσεις προς τη βιβλιοθήκη. Αφού γίνει η ανίχνευση της φθορίζουσας ουσίας απομακρύνεται η ουσία αυτή μαζί με τα τρία τελευταία νουκλεοτίδια του οκταμερούς. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για 5 με 7 κύκλους πριν γίνει επαναφορά του συστήματος στην αρχική κατάσταση και απομακρυνθεί ο εκκινητής και τα συνδεδεμένα μόρια. Στη συνέχεια, προσδένεται εκκινητής στη N-1 θέση και ξεκινάει η διαδικασία από την αρχή. Η επαναφορά του συστήματος στην αρχική κατάσταση γίνεται για 5 φορές. Τελικά οι 5-7 αντιδράσεις πρόσδεσης που ακολουθούνται από 5 κύκλους επαναφοράς του εκκινητή δίνουν δεδομένα αλληλουχίας για περίπου 35 συνεχόμενες βάσεις, όπου κάθε βάση έχει επιβεβαιωθεί από δύο διαφορετικά ολιγονουκλεοτίδια (εικ.22).



**Εικόνα 22:** Η αλληλούχηση με πρόσδεση που λαμβάνει χώρα στην πλατφόρμα της SOLID.

#### A.4.4 ION TORRENT

Στην πλατφόρμα της Ion Torrent™ ο προσδιορισμός της αλληλουχίας DNA βασίζεται στην ανίχνευση των ιόντων υδρογόνου που απελευθερώνονται κατά την διάρκεια του πολυμερισμού του DNA. Όπως και στις προηγούμενες πλατφόρμες έτσι και σε αυτή η δημιουργία της βιβλιοθήκης γίνεται είτε με θραυσματοποίηση του DNA είτε με PCR με χρήση ομάδων εκκινητών, στις οποίες σκοπός είναι η παραγωγή τμημάτων DNA που περικλείονται από αλληλουχίες προσαρμογείς. Η ενίσχυση της βιβλιοθήκης γίνεται με PCR σε γαλάκτωμα, στην οποία προστίθενται οι βιβλιοθήκες, τα αντιδραστήρια PCR, και η DNA πολυμεράση. Το μείγμα που προκύπτει τοποθετείται σε συσκευή που εκτελεί θερμική κυκλοποίηση του γαλακτώματος, επιτρέποντας την αποτελεσματική ενίσχυση. Στα επόμενα βήματα γίνεται διαχωρισμός του ελαίου από το υδατικό διάλυμα και τα σφαιρίδια ώστε στη συνέχεια να λάβει χώρα ο εμπλουτισμός των σφαιριδίων που ενισχύθηκαν επιτυχώς. Τα εμπλουτισμένα σφαιρίδια τοποθετούνται σε Ion chip, δηλαδή ένα εξειδικευμένο chip πυριτίου που έχει σχεδιαστεί για την ανίχνευση μεταβολών του pH στο εσωτερικό από τα επιμέρους φρεάτια. Η άνω επιφάνεια του chip χρησιμοποιείται ως αγωγός μικροροής ώστε να παραδοθούν τα αντιδραστήρια που απαιτούνται για την αντίδραση αλληλούχησης. Η κάτω επιφάνεια του chip διασυνδέεται άμεσα με έναν ανιχνευτή ιόντων υδρογόνου, που μεταφράζει την απελευθέρωση των ιόντων σε κάθε φρεάτιο σε ποσοτική ένδειξη νουκλεοτιδίων που ενσωματώθηκαν σε κάθε στάδιο της αντίδρασης (εικ.23).



**Εικόνα 23:** (Α) Δομή του Ion Torrent Chip που χρησιμοποιείται στον προσδιορισμό της αλληλουχίας. (Β) Ανίχνευση του pH μετά την ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων.

## A.5 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗΣ

Η Sanger αλληλουχεί τμήματα DNA που έχουν μήκος μέχρι 900 bp ανά αντίδραση. Για να γίνει αλληλούχηση μεγαλύτερου αριθμού βάσεων απαιτούνται περισσότερες από μια αντιδράσεις. Με τη μέθοδο αυτή μπορούν να λάβουν χώρα μέχρι 384 αντιδράσεις ταυτόχρονα. Το γεγονός αυτό καθιστά τη μέθοδο ακριβή σε σχέση με τις υπόλοιπες.

Οι διάφορες πλατφόρμες NGS που δημιουργήθηκαν έχουν τη δυνατότητα να εκτελούν εκατομμύρια αντιδράσεις ταυτόχρονα.

Το σύστημα 454 μπορεί να διαβάσει μέχρι 1 εκατομμύριο βάσεις ανά αντίδραση, ενώ το μήκος κάθε αλληλουχίας κυμαίνεται από 400 μέχρι 700 bp<sup>53</sup>. Η αλληλούχηση με αυτή τη πλατφόρμα είναι μία αρκετά γρήγορη διαδικασία και παρουσιάζει μεγάλο μήκος αλληλουχιών διαβάσματος. Παρόλα αυτά είναι ακριβή μέθοδος και παρουσιάζει πρόβλημα στην αλληλούχηση των ομοπολυμερών περιοχών.<sup>Error! Bookmark not defined.</sup>

Η Illumina/Solexa διαβάζει μέχρι 6 δισεκατομμύρια βάσεις ανά αντίδραση. Το μήκος κάθε αλληλουχίας που διαβάζεται είναι 50-300 bp<sup>52</sup>. Η πλατφόρμα αυτή έχει αρκετά καλή απόδοση και για αυτό το λόγο αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες πλατφόρμες. Παρόλα αυτά δίνει μικρό μήκος αλληλουχιών διαβάσματος, ενώ ο εξοπλισμός είναι ακριβός και απαιτεί υψηλές συγκεντρώσεις DNA.<sup>Error! Bookmark not defined.</sup>

Η πλατφόρμα SOLID εμφανίζει μικρό μήκος αλληλουχίας διαβάσματος, δηλαδή περίπου στα 35 bp αλλά ο αριθμός των βάσεων που διαβάζονται ανά αντίδραση κυμαίνεται από 1.2 μέχρι 1.4 δισεκατομμύρια. Ένα βασικό πλεονέκτημα της πλατφόρμας αυτής είναι το χαμηλό κόστος ανά βάση, αλλά είναι πιο αργή από τις άλλες.<sup>Error! Bookmark not defined.</sup>

Τέλος, η Ion Torrent, η οποία κυκλοφόρησε το PGM παρουσιάζει μεγαλύτερη ταχύτητα και χαμηλότερο κόστος. Το PGM διαβάζει έως και 80 εκατομμύρια βάσεις ανά αντίδραση και το μήκος της αλληλουχίας διαβάσματος είναι περίπου 400 bp<sup>54</sup>. Ένα βασικό μειονέκτημα της πλατφόρμας είναι η αδυναμία διαβάσματος ομοπολυμερών<sup>39</sup>.

# ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---

## B.1 ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη του πρωτοκόλλου Ion Torrent NGS για το γονίδιο *SERPING1* με το μηχάνημα PGM. Παράλληλα γίνεται αξιολόγηση της μεθόδου αυτής ως προς την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων, μικρών και μεγάλων προσθηκών και ελλείψεων που σχετίζονται με το κληρονομικό αγγειοίδημα και έχουν ανιχνευτεί και με άλλες μεθόδους (Sanger, MLPA, Long Range PCR).

## B.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΥΛΙΚΑ

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη παρουσιάζονται στον πίνακα 2.

Όνομα kit	Αντιδραστήριο	Συστατικά	Αριθμός καταλόγου	Προέλευση
Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0	Kit δημιουργίας Βιβλιοθήκης Ion AmpliSeq™ 2.0	5X Ion AmpliSeq™ HiFi Mix	4475345	Life Technologies
		FuPa Reagent		
		Switch Solution		
		DNA Ligase		
		Ion AmpliSeq™ Adapters		
		Platinum® PCR SuperMix HiFi		
		Library Amplification Primer Mix		
		Low TE		
Ion Xpress™ Barcode Adapters 17–32 Kit	Προσαρμογείς-κωδικοί ιχνηλασιμότητας Ion Xpress™ 17–32 Kit	Ion Xpress™ P1 Adapter	4474009	Life Technologies
		Ion Xpress™ Barcode X (16)		
Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Solutions	Ion PGM™ Hi-Q™ διαλύματα αλληλούχησης	Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing W2 Solution	A25589	Life Technologies
		Ion PGM™ Cleaning Tablet Annealing Buffer		
		Ion PGM™ Sequencing W3 Solution		
Qubit® dsDNA HS Assay Kits	Qubit® dsDNA HS Assay Kits	Qubit® dsDNA HS Reagent	Q32851, Q32854	Life Technologies
		Qubit® dsDNA HS Buffer		
		Qubit® dsDNA HS Standard #1		
		Qubit® dsDNA HS Standard #2		

**Πίνακας 2:** Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και τα χαρακτηριστικά τους.



Όνομα kit	Αντιδραστήριο	Συστατικά	Αριθμός καταλόγου	Προέλευση
Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing dNTPs	Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing dNTPs	Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing dGTP	A25590	Life Technologies
		Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing dCTP		
		Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing dATP		
		Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing dTTP		
	Υδροξείδιο του νατρίου	1 M NaOH	-	Life Technologies
	Υδροξείδιο του νατρίου	NaOH (10 M)	-	Life Technologies
iPrep Pure Link DNA blood kit			1691440	Invitrogen
Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Αντιδραστήρια	Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Reagents	Ion PGM™ Hi-Q™ Reagent Mix	A27743	Life Technologies
		Ion PGM™ Hi-Q™ Enzyme Mix Ion		
		PGM™ Hi-Q™ ISPs		
Ion PGM™ Hi-Q™ αντι-δραστήρια αλληλούχησης	Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Reagents	Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Polymerase	A25588	Life Technologies
		Sequencing Primer Control Ion		
		Sphere™ Particles		
Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Διαλύματα	Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Solutions	Ion OneTouch™ Breaking Solution	A27742	Life Technologies
		Ion OneTouch™ Oil		
		Ion OneTouch™ Reaction Oil		
		Nuclease-free Water		
		Ion PGM™ OT2 Recovery Solution		
		Neutralization Solution		
		Ion OneTouch™ Wash Solution		
		MyOne™ Beads Wash Solution		
		Tween® Solution		

**Πίνακας 2:** (συνέχεια)

Τα αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη παρουσιάζονται στο πίνακα 3 και στο πίνακα 4.

Αναλώσιμα	Όνομα προϊόντος	Αριθμός καταλόγου	Προέλευση
Ταινίες Optical για πιάτο με 96-φρεάτια	MicroAmp Optical 96-Well	N8010560	Applied Biosystems
Αυτοκόλλητη ταινία MicroAmp®	MicroAmp® Clear Adhesive Film	4306311	Life Technologies
Φιαλίδιο για PCR 0,5 ml	PCR TUBES 0.5 ml thin wall, clear	321-05-051	AXYGEN
Φιαλίδιο για PCR 0,2 ml	0.2-mL PCR tubes	6571	Costar
Φιαλίδιο Eppendorf LoBind® 1,5 ml	1.5-mL Eppendorf LoBind® Tubes	22431021	Eppendorf
Κωνικό Φιαλίδιο 15 ml	Tube rack to fit 15-mL conical tube	ET5015B	Euroclone
Κωνικό Φιαλίδιο 15 ml	Tube rack for 50-mL conical tube	ET5050B	Euroclone
Βαθμονομημένη πιπέτα P100	Pipette F123615 P100	DA53897	Gilson
Βαθμονομημένη πιπέτα P10	Pipette F144802 P10	CN52287	Gilson
Βαθμονομημένη πιπέτα P20	Pipette F123600 P20	DA54373	Gilson
Ρύγχη πιπέτας 200 µL	TIPS D200ST	F171301	Gilson
Ρύγχη πιπέτας 10 µL	TIPS DFL10ST	F161450	Gilson
Μαγνήτης για πιάτο με 96 φρεάτια DynaMag™	DynaMag™-96 Side	12331D	Life Technologies
Μαγνήτης DynaMag™	DynaMag™-2 magnet	12321D	Life Technologies
Δεξαμενή πεπιεσμένου αζώτου	Tank of compressed nitrogen	300311-00015908	Linde
Γυάλινη φιάλη ( 1 λίτρο)	Glass bottle (1 L)	-	-
Σύριγγα 10 CC	Syringe, 10 CC, Female Luer Lock	-	-
Μπουκάλι αποβλήτων 2,5 L	Ion PGM™ 2.5 L Waste Bottle	4482565	Life Technologies
Πιάτο αντίδρασης χωρίς barcode	Reaction Plate no Bar-code 10/pkg		

**Πίνακας 3:** Αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και χαρακτηριστικά τους.

Όνομα kit	Αναλώσιμα	Συστατικά kit	Αριθμός καταλόγου	Προέλευση
Υλικά Ion PGM™ OT2	Ion PGM™ OT2 Supplies	Ion OneTouch™ Reagent Tubes Ion OneTouch™ Recovery Routers Ion OneTouch™ Recovery Tubes Ion OneTouch™ Sippers Ion OneTouch™ 2 Amplification Plate Ion OneTouch™ Cleaning Adapter Ion OneTouch™ Reaction Filter Ion OneTouch™ ES Supplies	A27744	Life Technologies
Υλικά αλληλούχησης Ion PGM™	Ion PGM™ Sequencing Supplies	Wash 1 Bottle w/ label (250 mL) Wash 3 Bottle w/ label (250 mL) Ion PGM™ Reagent Bottle Sipper Tubes Ion PGM™ Wash Bottle Sipper Tubes Reagent Bottles w/ labels (50 mL)	A25587	Life Technologies

**Πίνακας 4:** Αναλώσιμα υλικά που ανήκουν σε kit και χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

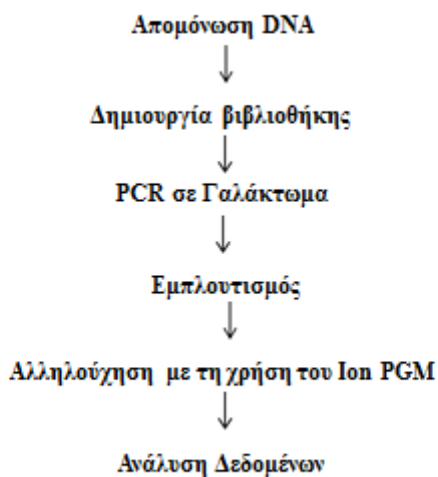
Τα μηχανήματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη παρουσιάζονται στο πίνακα 5.

Μηχανήματα	Όνομα μηχανήματος	Αριθμός καταλόγου	Προέλευση
Θερμοκυκλοποιητής	Veriti® 96-well Thermal Cycler	2990224332	Life Technologies
Φθοριόμετρο Qubit® 2.0	Qubit® 2.0 Fluorometer	Q32866	Life Technologies
Φυγόκεντρος για πιάτο με 96 φρεάτια	96-well plate centrifuge	41011433	Thermo
Περιστροφικός αναδευτήρας πιάτου	Plate orbital shaker	5353AH710086	Eppendorf
Αναδευτήρας	Vortex	'01.438340	Gilson
Μηχάνημα Ion OneTouch™ 2	Ion OneTouch™ 2 Instrument	2456428-2251	Life Technologies
Ion OneTouch™ ES	Ion OneTouch™ ES	42-0911	Life Technologies
Μικροφυγόκεντρος	Microcentrifuge	40979526	Thermo
Μικροφυγόκεντρος για Ion PGM™ Chip	Ion PGM™ Chip Mini-fuge	1309 1266	Life Technologies
Θερμικό Μπλοκ ρυθμισμένου στους 50°C	Heat block set to 50°C	8353104	MEDINGEN
Σύστημα καθαρισμού του νερού	water purification system	41634724	Thermo
torrent διακομιστή	Torrent Server	274670120	Life Technologies
Μηχάνημα Ion PGM™	Ion PGM™ System	4462921	Life Technologies
DNA extractor	IPREP	0809D0094 0810D0105	Fisher Scientific

**Πίνακας 5:** Μηχανήματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

### B.3 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Η ροή εργασιών που ακολουθήθηκε στη παρούσα μελέτη φαίνεται στο σχεδιάγραμμα που ακολουθεί στην εικόνα 24.



Εικόνα 24: Ροή εργασιών πειράματος.

#### B.3.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ PANEL ΣΤΗΝ ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΑ ΤΗΣ AMPLISEQ

Για την ανίχνευση γνωστών και άγνωστων μεταλλάξεων σε επιλεγμένα γονίδια χρησιμοποιείται η τεχνολογία Ampliseq (Ion Torrent). Στη τεχνολογία αυτή ενισχύονται και αλληλουχούνται επιλεγμένες περιοχές που συνθέτουν ένα panel γονιδίων-στόχων. Στη παρούσα μελέτη το panel σχεδιάστηκε με τη βοήθεια των εργαλείων που παρέχει η ιστοσελίδα Ampliseq.com. Το panel που σχεδιάστηκε περιέχει τις εξωνικές περιοχές του γονιδίου *SERPING1*, τις ιντρονικές, τις θέσεις σύνδεσης εξονίων-ιντρονίων και τον υποκινητή του γονιδίου. Επιπλέον, το panel αυτό περιέχει τις κωδικοποιούσες αλληλουχίες και άλλων γονιδίων σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Τα γονίδια αυτά είναι το *F12*, *SERPINC1*, *A2M*, *SERPINF1*, *SERPINA1*, *SERPINE1*, *SERPINB2*, *ACE*, *XPNPEP1*, *XPNPEP2*, *XPNPEP3*, *BDKRB1*, *BDKRB2*, *PLG*, *KLKB1*, *KLK1*, *KLK3*, *PLAT*, *PLAU*, *C1R*, *C1S*, *MASP1*, *MASP2*, *F2*, *PROC*, *F13A1*, *F13B*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR9*, *HRH1*, *IL5*, *TNF*, *HSP90AA1*, *KLK2*, *ESRRA*, *PER1*, *AR*, *ELANE*, *MPO*, *TPSAB1*, *TPSD1*, *TPSG1*, *KNG1*, *TAC1*, *CPM*, *CPN1*, *PRCP*, *DPP4*, *MME*, *PLAUR*, *F11*, *KRT1* και *CIQBP*. Ο σκοπός της προσθήκης των επιπλέον γονιδίων αποτελεί το γεγονός ότι λαμβάνουν μέρος στο μεταβολισμό της βραδυκινίνης. Η αξιολόγηση των μεταλλάξεων στα γονίδια που προστέθηκαν στο νέο panel εκτός του γονιδίου *SERPING1* δεν αποτελούν τμήμα της παρούσας μελέτης και δεν θα σχολιαστούν περαιτέρω. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για να γίνει ο σχεδιασμός αναφέρονται αναλυτικά στο παράρτημα 1.

#### B.3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Για να λάβει χώρα η απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε το iPrep™ Purelink gDNA Blood kit και η διαδικασία έλαβε χώρα στο μηχάνημα iPrep™ Invitrogen. Οι διαδικασίες που ακολουθήθηκαν έγιναν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή του μηχανήματος για την απομόνωση DNA από αίμα. Στη συνέχεια μετρήθηκε η συγκέντρωση του DNA με τη χρήση του Qubit® dsDNA HS Assay Kits στο μηχάνημα Fluorometer Qubit® 2.0 σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η συγκέντρωση του γενωμικού DNA πρέπει να είναι 10 ng.

### **B2.3 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ**

Για την δημιουργία της βιβλιοθήκης χρησιμοποιήθηκε το kit: Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 και η διαδικασία εκτελέστηκε στο μηχάνημα Veriti Thermal Cycler σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή για τη δημιουργία της βιβλιοθήκης. Η ποσοτικοποίηση των βιβλιοθηκών έγινε με το Qubit® dsDNA HS Assay Kits στο μηχάνημα Fluorometer Qubit® 2.0 σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Συνοπτικά, ξεκινώντας με 10 ng γενωμικό DNA έγινε ενίσχυση των επιθυμητών περιοχών με τη χρήση ζευγών εκκινητών και μείγματος ειδικό για την PCR που έλαβε χώρα. Στη συνέχεια, έγινε πέψη των εκκινητών με τη χρήση του αντιδραστηρίου Fura και πρόσδεση των προσαρμογέων και των κωδικών ιχνηλασιμότητας με τη χρήση του ενζύμου DNA λιγάση. Οι προσαρμογείς, δηλαδή γνωστές αλληλουχίες που θα προσδεθούν στα δύο άκρα των πολλαπλασιασμένων περιοχών θα χρησιμοποιηθούν ως αλληλουχίες για πρόσδεση εκκινητών και για να προσδεθούν αυτά τα τμήματα DNA σε σφαιρίδια κατά τη διάρκεια της PCR σε γαλάκτωμα. Οι κωδικοί ιχνηλασιμότητας είναι γνωστές αλληλουχίες, διαφορετικές για κάθε δείγμα οι οποίες σκοπό έχουν να διαχωρίζουν τα δείγματα μεταξύ τους. Τελευταίο βήμα αυτής της διαδικασίας αποτέλεσε η ποσοτικοποίηση της βιβλιοθήκης ώστε να γίνει γνωστή η συγκέντρωση της και να υπολογιστεί ο παράγοντας αραιώσης. Οι βιβλιοθήκες αραιώθηκαν στα 100 pM και έγινε συνδυασμός τους, προσθέτοντας ίσες ποσότητες από τις διαφορετικές βιβλιοθήκες. Η διαδικασία παρουσιάζεται πιο αναλυτικά στο παράρτημα 2.

### **B.3.4 PCR ΣΕ ΓΑΛΑΚΤΩΜΑ**

Η PCR σε Γαλάκτωμα χρησιμοποιήθηκε για την αντιγραφή αλληλουχιών DNA σε σφαιρίδια. Η διαδικασία έλαβε χώρα στο Ion OneTouch™ 2 Instrument (εικ.25) βάση των οδηγιών του κατασκευαστή. Το kit που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 (περιέχει τα παρακάτω Ion PGM™ OT2 Supplies, Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Reagents, Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Solutions, Ion PGM™ Calibration Standard).

Αρχικά το δίκλωνο DNA με προσαρμογείς αποδιατάσσεται με θέρμανση. Στη συνέχεια προστέθηκαν οι βιβλιοθήκες, τα ένζυμα και τα ISPs σφαιρίδια. Χρησιμοποιήθηκαν πάνω από ένα δισεκατομμύριο σφαιρίδια με έναν εκκινητή που ταιριάζει με τους προσαρμογείς. Το DNA συνδέθηκε σε αυτά τα σφαιρίδια και στη συνέχεια έλαβε χώρα PCR. Μετά την ενίσχυση των κλώνων DNA προέκυψε ένα εναιώρημα κενών, κλωνικά και μη-κλωνικά ενισχυμένων σφαιριδίων. Η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά στο παράρτημα 3.



**Εικόνα 25:** Τα διάφορα μέρη του Ion OneTouch™ 2 Instrument 1) Ion OneTouch™ Reaction Filter, 2) Χερσούλι για να γίνεται χειρισμός του Amplification Plate στο heat block , 3) Waste Container, 4) Ion OneTouch™ Oil, 5) Ion OneTouch™ Recovery Solution, 6) Ειδική υποδοχή για να κρατάει το πλαστικό σωληνάριο που συγκρατεί τη βελόνα, 7) Oil waste tray, 8) Φυγόκεντρος για τα Recovery Tubes και τα Recovery Router, 9 ) Ion OneTouch™ DL Injector Hub, 10) Οθόνη αφής του μηχανήματος.

### B.3.5 ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ (ENRICHMENT)

Με τον εμπλουτισμό έγινε απομάκρυνση των ISPs που δεν έλαβαν βιβλιοθήκη και αποδιάταξη της για να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί ο ένας κλώνος ως αλληλουχία πρότυπο. Η απομάκρυνση των κενών ISPs έγινε με τη χρήση της βιοτίνης που είναι συνδεδεμένη με τον εκκινητή και της στρεπταβιδίνης που είναι συνδεδεμένη με τα μαγνητικά σφαιρίδια. Η στρεπταβιδίνη συνδέθηκε με τη βιοτίνη και έτσι απομακρύνθηκαν τα σφαιρίδια χωρίς ενισχυμένη βιβλιοθήκη.

Το μηχανήμα που χρησιμοποιήθηκε είναι το Ion OneTouch™ ES και το kit το Ion PGM™ Hi-Q™ OT2. Η διαδικασία έλαβε χώρα σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αναλυτικά η διαδικασία που έλαβε χώρα περιγράφεται στο παράρτημα 4.

### B.3.6 ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ION PGM

Η αλληλούχηση έγινε με τη χρήση του Ion PGM™ System (εικ. 26). Το kit που χρησιμοποιείται είναι το Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Kit και οι διαδικασίες έλαβαν χώρα σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.



**Εικόνα 26:** Τα μέρη του Ion PGM™ System : A)Οθόνη Αφής, B)Chip clamp, C) Επιφάνεια γείωσης, D) Power button, E) Reagent bottles, F) Wash 1 Bottle (W1 position), G) Wash 2 Bottle (W2 position), H) Wash 3 Bottle (W3 position),I) Waste Bottle.

Αρχικά έγινε προγραμματισμός του πειράματος στο μηχάνημα και καθαρισμός του με χλωρίνη και νερό. Στη συνέχεια έγινε προετοιμασία αυτού και του chip και εκκίνηση της αλληλούχησης. Η ροή των διαδικασιών που θα λάβουν χώρα στην αλληλούχηση παρουσιάζονται στο παράρτημα 5.

### B.3.7 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΕΔΟΜΕΝΩΝ

Η αρχική εικόνα των αποτελεσμάτων δόθηκε από τον Torrent Server του Ion PGM™ System. Σημαντικές πληροφορίες για την αξιολόγηση των πειραμάτων αποτέλεσαν: η ενότητα «ISP Density», στην οποία φαίνεται ο τρόπος με τον οποίο έχουν φορτωθεί τα ISPs στο chip και η ενότητα «ISP summary», στην οποία παρέχονται πληροφορίες για το ποσοστό του chip που έχει καλυφθεί με ISPs, το ποσοστό από τα άδεια φρεάτια του chip, το ποσοστό εμπλουτισμού των σφαιριδίων, το ποσοστό των μονοκλωνικών και πολυκλωνικών σφαιριδίων που παράχθηκαν καθώς και το ποσοστό της τελικής βιβλιοθήκης. Όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό φόρτωσης τόσο μεγαλύτερο μέρος του chip έχει καλυφθεί με ISPs (παράδειγμα πειράματος με μεγάλο αποτέλεσμα φόρτωσης φαίνεται στην εικ.27, ενώ παράδειγμα πειράματος με χαμηλό αποτέλεσμα φόρτωσης του chip στην εικ.28). Το ποσοστό εμπλουτισμού των ISPs πρέπει να είναι περίπου 100%, ενώ το ποσοστό των πολυκλωνικών σφαιριδίων πρέπει να είναι περίπου 25% για να θεωρηθεί το αποτέλεσμα αξιόπιστο.

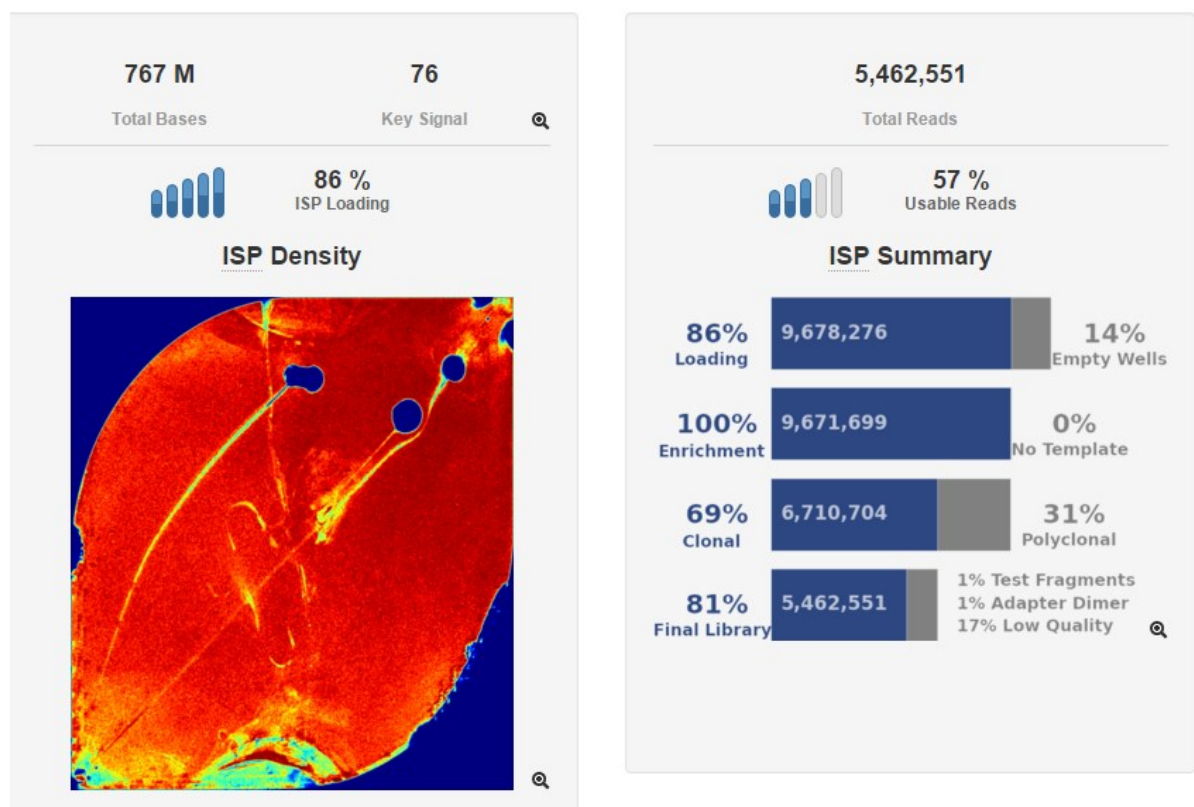
Στη συνέχεια, στον πίνακα «Coverage Analysis» παρέχονται πληροφορίες για κάθε δείγμα ξεχωριστά. Με την επιλογή κάθε δείγματος από τον πίνακα εμφανίζεται η σελίδα «Coverage Analysis Report» που παρέχει αναλυτικές πληροφορίες για τα αποτελέσματα κάθε δείγματος ξεχωριστά. Για να μπορέσει να γίνει εκτίμηση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων πρέπει κάθε



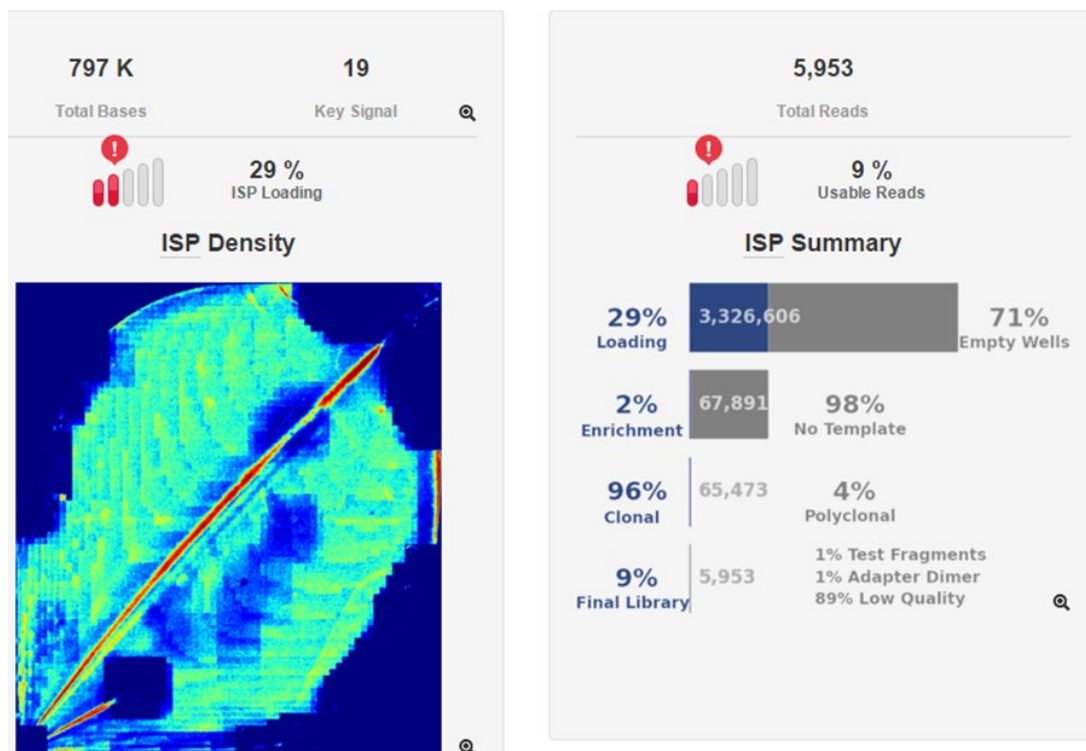
βάση του τμήματος DNA που ζητήθηκε να αλληλουχηθεί να έχει διαβαστεί τουλάχιστον μία φορά, δηλαδή το «Target base coverage 1x» πρέπει να είναι πολύ κοντά στο 100% και το «Target base coverage 20x» πρέπει να είναι περίπου 98-100% ώστε κάθε βάση του τμήματος DNA που ζητήθηκε να αλληλουχηθεί πρέπει να έχει διαβαστεί τουλάχιστον είκοσι φορές. Σημαντικό για την ανάλυση των αποτελεσμάτων είναι επίσης το διάγραμμα που θα πρέπει να παρουσιάζει μία σχετική ομοιομορφία, καθώς δείχνει πως διαβάστηκε κάθε κομμάτι από το τμήμα DNA που αλληλουχήθηκε (παράδειγμα αξιόπιστων αποτελεσμάτων αποτελεί η εικ.29, ενώ μη αξιόπιστων η εικ.30).

Επιπρόσθετα, στον πίνακα «Variant Caller» φαίνονται για κάθε δείγμα ο αριθμός των μεταλλάξεων. Με την επιλογή ενός δείγματος από τον πίνακα εμφανίζεται η σελίδα «Variant Caller» που παρέχει πληροφορίες για όλες τις μεταλλάξεις που εμφανίζει το δείγμα. Σε κάθε αλλαγή που παρατηρείται είτε είναι αντικατάσταση μία βάσης, είτε έλλειψη είτε προσθήκη περισσότερων βάσεων δίνεται η θέση της μετάλλαξης αυτής στο χρωμόσωμα, το ποσοστό με το οποίο εμφανίζεται στο δείγμα, το αν πρόκειται για SNP, προσθήκη ή έλλειψη και σε ποιο amplicon παρατηρήθηκε η συγκεκριμένη μετάλλαξη (εικ.31).

Τέλος, με την επιλογή της κάθε μετάλλαξης υπάρχει η δυνατότητα απεικονιστικής παρακολούθησης με τη χρήση του IGV (Integrative Genomics Viewer) των διαφορετικών amplicons, τα οποία είναι στοιχισμένα κάτω από την αλληλουχία πρότυπο και έτσι δίνεται η δυνατότητα σύγκρισης και παρακολούθησης των μεταλλάξεων καθώς και της αδυναμίας κάλυψης κάποιων περιοχών από amplicons (εικ.32).



**Εικόνα 27:** Αρχικά αποτελέσματα φόρτωσης των ISPs στο chip. Τα αποτελέσματα σε αυτή την εικόνα είναι παράδειγμα μεγάλου ποσοστού φόρτωσης.



**Εικόνα 28:** Αρχικά αποτελέσματα φόρτωσης των ISPs στο chip. Τα αποτελέσματα σε αυτή την εικόνα είναι παράδειγμα μικρού ποσοστού φόρτωσης.

## Coverage Analysis Report

Sample Name: 3336

IonXpress\_017\_R\_2015\_11\_19\_19\_01\_42\_user\_SN2-5-20151119\_SERPING1\_Auto\_user\_SN2-5-20151119\_SERPING1\_45

Library type: AmpliSeq DNA

Reference: hg19

Target regions: IAD79572\_197\_Designed



Διάγραμμα που δείχνει τον τρόπο που έχει διαβαστεί η αλληλουχία. Σημαντικό είναι το διάγραμμα να παρουσιάζει ομοιομορφία

Amplicon Read Coverage		Target Base Coverage	
Number of amplicons	121	Bases in target regions	30,555
Percent assigned amplicon reads	56.46%	Percent base reads on target	70.54%
Average reads per amplicon	1,050	Average base coverage depth	783.8
Uniformity of amplicon coverage	91.74%	Uniformity of base coverage	87.53%
Amplicons with at least 1 read	100.00%	Target base coverage at 1x	100.00%
Amplicons with at least 20 reads	99.17%	Target base coverage at 20x	98.31%
Amplicons with at least 100 reads	95.04%	Target base coverage at 100x	90.49%
Amplicons with at least 500 reads	77.69%	Target base coverage at 500x	60.45%
Amplicons with no strand bias	94.21%	Target bases with no strand bias	72.02%
Amplicons reading end-to-end	28.10%	Percent end-to-end reads	49.13%

Κάθε βάση του τμήματος DNA που ζητήθηκε να αλληλουχηθεί έχει διαβαστεί τουλάχιστον μία φορά

Κάθε βάση του τμήματος DNA που ζητήθηκε να αλληλουχηθεί έχει διαβαστεί τουλάχιστον είκοσι φορές

**Εικόνα 29:** Η σελίδα «Coverage Analysis Report» για ένα δείγμα που τα αποτελέσματα του είναι αξιόπιστα καθώς κάθε βάση του τμήματος DNA έχει διαβαστεί τουλάχιστον μία φορά.

## Coverage Analysis Report

Sample Name: 3001N

IonXpress\_025\_R\_2016\_04\_06\_18\_16\_48\_user\_SN2-12-NGSHAE001\_Auto\_user\_SN2-12-NGSHAE001\_58

Library type: AmpliSeq DNA

Reference: hg19

Target regions: IAD92366\_241\_Designed



Οι περισσότερες βάσεις του δείγματος αυτού δεν έχουν διαβαστεί

Amplicon Read Coverage		Target Base Coverage	
Number of amplicons	825	Bases in target regions	219,384
Percent assigned amplicon reads	90.28%	Percent base reads on target	93.17%
Average reads per amplicon	0.653	Average base coverage depth	0.333
Uniformity of amplicon coverage	91.13%	Uniformity of base coverage	94.58%
Amplicons with at least 1 read	32.12%	Target base coverage at 1x	18.64%
Amplicons with at least 20 reads	0.00%	Target base coverage at 20x	0.00%
Amplicons with at least 100 reads	0.00%	Target base coverage at 100x	0.00%
Amplicons with at least 500 reads	0.00%	Target base coverage at 500x	0.00%
Amplicons with no strand bias	99.88%	Target bases with no strand bias	100.00%
Amplicons reading end-to-end	2.42%	Percent end-to-end reads	26.72%

Κάθε βάση του τμήματος DNA που ζητήθηκε να αλληλουχηθεί δεν έχει διαβαστεί ούτε μία φορά

**Εικόνα 30:** Η σελίδα «Coverage Analysis Report» για ένα δείγμα που τα αποτελέσματα του δεν είναι αξιόπιστα καθώς κάθε βάση του τμήματος DNA δεν έχει διαβαστεί μία φορά.



Θέση μετάλλαξης

Η αλλαγή που παρατηρείται

Το ποσοστό που εμφανίζεται η συγκεκριμένη μετάλλαξη στο δείγμα που καθορίζει αν η μετάλλαξη είναι ομόζυγη ή ετερόζυγη

Είδος μετάλλαξης

Το amplicon που εμφανίζεται η συγκεκριμένη μετάλλαξη

	Position	Ref	Variant	Allele Call	Frequenc...	Quality	Variant Type	Allele Source	Allele Name	Gene ID	Region Name
<input type="checkbox"/>	chr11:57356907	T	C	Homozygous	100.0 %	1555.7	SNP	Novel	---	unknown	AMPL7160251841
<input type="checkbox"/>	chr11:57357305	G	A	Homozygous	100.0 %	22889.9	SNP	Novel	---	unknown	AMPL7160251798
<input type="checkbox"/>	chr11:57357593	T	C	Homozygous	100.0 %	3396.8	SNP	Novel	---	unknown	AMPL7160251798
<input type="checkbox"/>	chr11:57357714	T	G	Homozygous	100.0 %	14660.1	SNP	Novel	---	unknown	AMPL7160251799
<input type="checkbox"/>	chr11:57358083	T	C	Homozygous	93.0 %	1266.1	SNP	Novel	---	unknown	AMPL7160251800
<input type="checkbox"/>	chr11:57358343	G	A	Homozygous	100.0 %	417.2	SNP	Novel	---	unknown	AMPL7160251674
<input type="checkbox"/>	chr11:57358431	-	AAA...	Homozygous	88.5 %	201.1	INS	Novel	---	unknown	AMPL7160251674
<input type="checkbox"/>	chr11:57359463	GTT...	-	Heterozygous	88.9 %	2305.0	DEL	Novel	---	unknown	AMPL7160251803
<input type="checkbox"/>	chr11:57360416	A	G	Homozygous	100.0 %	11932.9	SNP	Novel	---	unknown	AMPL7160251684
<input type="checkbox"/>	chr11:57361072	T	C	Homozygous	100.0 %	7539.9	SNP	Novel	---	unknown	AMPL7160251686
<input type="checkbox"/>	chr11:57361589	T	C	Homozygous	100.0 %	4492.7	SNP	Novel	---	unknown	AMPL7160251688
<input type="checkbox"/>	chr11:57361613	A	T	Homozygous	97.2 %	4120.0	SNP	Novel	---	unknown	AMPL7160251688
<input type="checkbox"/>	chr11:57362211	T	A	Homozygous	100.0 %	1740.2	SNP	Novel	---	unknown	AMPL7160251691
<input type="checkbox"/>	chr11:57362617	C	G	Homozygous	100.0 %	18479.6	SNP	Novel	---	unknown	AMPL7160251806
<input type="checkbox"/>	chr11:57362708	A	G	Homozygous	100.0 %	2490.4	SNP	Novel	---	unknown	AMPL7160251694
<input type="checkbox"/>	chr11:57362803	G	A	Homozygous	100.0 %	4714.1	SNP	Novel	---	unknown	AMPL7160251694
<input type="checkbox"/>	chr11:57363543	G	A	Homozygous	100.0 %	6103.9	SNP	Novel	---	unknown	AMPL7160251696
<input type="checkbox"/>	chr11:57363761	T	C	Homozygous	100.0 %	6871.2	SNP	Novel	---	unknown	AMPL7160251807
<input type="checkbox"/>	chr11:57363870	-	TG	Homozygous	95.9 %	1667.1	INS	Novel	---	unknown	AMPL7160251807
<input type="checkbox"/>	chr11:57363871	T	G	Heterozygous	47.9 %	934.9	SNP	Novel	---	unknown	AMPL7160251807

View Allele Annotations View Coverage Metrics View Quality Metrics

Export Selected Selected 0 of 49 Showing 1 - 20 of 49 ← Back Next →

**Εικόνα 31:** Η σελίδα «Variant Caller» που παρέχει πληροφορίες για όλες τις μεταλλάξεις που εμφανίζει κάθε δείγμα.



**Εικόνα 32:** Δυνατότητα παρακολούθησης των διαφορετικών amplicons, τα οποία είναι στοιχισμένα κάτω από την αλληλουχία πρότυπο και έτσι δίνεται η δυνατότητα σύγκρισης και παρακολούθησης των μεταλλάξεων καθώς και της αδυναμίας κάλυψης κάποιων περιοχών από amplicon s (IGV αρχείο).

Στη συνέχεια, περαιτέρω ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε στο λογισμικό της Ion Torrent (Thermo Fisher). Τα αρχεία που αφορούσαν τα δείγματα, αφού ανέβηκαν στο συγκεκριμένο λογισμικό εμφανίστηκαν στη καρτέλα «Analysis».

Αναλυτικά στο συγκεκριμένο λογισμικό: στη καρτέλα «Summary» δίνονται όλες οι σημειακές μεταλλάξεις, οι μικρές προσθήκες και ελλείψεις που παρουσιάζει ένα δείγμα. Για κάθε μετάλλαξη δίνεται η θέση της, η διαφορά με την αλληλουχία πρότυπο, το είδος της μετάλλαξης, το μέγεθος της, το γονίδιο στο οποίο εμφανίζεται και το αν η περιοχή στην οποία εμφανίζεται είναι ιντρονική ή εξωνική (εικ.33).

Summary Functional Population Ontologies Pharmacogenomics Somatic QC							
Search Actions							
Locus	Genotype	Ref	Type	Length	Genes	Location	No Call Reason
chr11:57368644	A/A	C	SNV	1	SERPING1	intronic	
chr11:57369352	A/G	A	SNV	1	SERPING1	intronic	
chr11:57370436	T/G	T	SNV	1	SERPING1	intronic	
chr11:57372150	A/T	A	SNV	1	SERPING1	intronic	
chr11:57373548	C/T	C	SNV	1	SERPING1	exonic	
chr11:57373675	T/C	T	SNV	1	SERPING1	exonic	
chr11:57377215	G/C	G	SNV	1	SERPING1	intronic	

**Εικόνα 33:** Η καρτέλα «Summary», στην οποία δίνονται όλες οι σημειακές μεταλλάξεις, οι μικρές προσθήκες και διαγραφές που εμφανίζονται σε ένα δείγμα. Για κάθε μετάλλαξη δίνεται η θέση της, η διαφορά με την αλληλουχία πρότυπο, το είδος της μετάλλαξης και το μέγεθος της, το γονίδιο στο οποίο εμφανίζεται και το αν η περιοχή στην οποία εμφανίζεται είναι ιντρονική ή εξωνική.

Στην καρτέλα «Functional» επαναλαμβάνονται οι ίδιες πληροφορίες με τη προηγούμενη καρτέλα αλλά προστίθεται σε ποια αλυσίδα έχει γίνει η μετάλλαξη («Strand»), ποιά η αλλαγή που προκαλείται στη κωδικοποιούσα αλληλουχία («Coding»), τί είδους μετάλλαξη είναι αυτή (συνώνυμη, έλλειψη, προσθήκη) («Variant Effect»), αν προκαλεί αλλαγή στην πρωτεΐνη και ποιά αλλαγή είναι αυτή.

Στη συνέχεια, δίνονται κάποιες μετρήσεις: αρχικά δίνεται η μέτρηση «Phylor», η οποία μετράει πόσο συντηρημένη είναι κάθε βάση στην εξέλιξη. Οι θετικές τιμές δείχνουν συντήρηση δηλαδή η εξέλιξη είναι πιο αργή από ότι αναμενόταν. Οι αρνητικές τιμές δείχνουν επιτάχυνση της εξέλιξης σε ταχέως εξελισσόμενες περιοχές. Στη συνέχεια δίνεται η μέτρηση SIFT, η οποία προβλέπει αν μια αντικατάσταση αμινοξέος επηρεάζει τη λειτουργία της πρωτεΐνης. Η βαθμολογία SIFT κυμαίνεται από 0,0 έως 1.0. Η βαθμολογία μπορεί να ερμηνευθεί ως εξής:

- 0,0 έως 0,05: Μεταλλάξεις με αυτές τις τιμές θεωρούνται επιβλαβείς. Μετάλλαξη με αποτελέσματα πιο κοντά στο 0,0 έχει μεγαλύτερη πιθανότητα να είναι επιβλαβής.
- 0,05 έως 1.0: Μεταλλάξεις με αυτό το εύρος έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να είναι ανεκτές. Μετάλλαξη με μέτρηση πιο κοντά στο 1.0 έχει πιο μεγάλη πιθανότητα να είναι ανεκτή.

Η τιμή «Grantham» επιχειρεί να προβλέψει την εξελικτική απόσταση μεταξύ δύο αμινοξέων. Η τιμή κυμαίνεται από 5 μέχρι 215. Χαμηλότερη τιμή Grantham αντικατοπτρίζει

μικρότερη εξελικτική απόσταση, ενώ μεγαλύτερη τιμή Grantham υποδηλώνει μεγαλύτερη εξελικτική απόσταση.

Η μέτρηση «PolyPhen» δείχνει τη πιθανότητα μία αντικατάσταση αμινοξέος να είναι επιβλαβής. Η τιμή κυμαίνεται από 0,0 έως 1,0. Η βαθμολογία μπορεί να ερμηνευτεί ως εξής:

- 0,0 έως 0,15: Μεταλλάξεις με αυτό το εύρος τιμών προβλέπεται να μην είναι επιβλαβείς.
- 0,15 έως 1,0: Μεταλλάξεις με αυτό το εύρος τιμών πιθανόν να είναι επιβλαβείς.
- 0,85 έως 1,0: Μεταλλάξεις με αυτό το εύρος τιμών προβλέπεται να είναι επιβλαβείς.

Στη καρτέλα «Population» δίνεται για τα χαρακτηρισμένα SNVs η αντίστοιχη καταχώρηση σε βάσεις δεδομένων (rs), η συχνότητα των παραλλαγών αυτών παγκοσμίως («MAF») και η συχνότητα των παραλλαγών αυτών στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό («EMAF»).

Στη καρτέλα «Ontology» χαρακτηρίζεται η παραλλαγή αυτή σύμφωνα με δύο βάσεις δεδομένων: την OMIN και την COSMIC. Η OMIN είναι μία βάση δεδομένων που περιέχει μία συλλογή από ανθρώπινα γονίδια και τους διαφορετικούς γενετικούς φαινοτύπους τους, ενώ η COSMIC είναι ένας κατάλογος με τις σωματικές μεταλλάξεις που οδηγούν σε καρκίνο.

Στην καρτέλα «Pharmacogenomics» οι μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν χαρακτηρίζονται ως προς δύο άλλες βάσεις δεδομένων, την DrugBank και την ClinVar. Η βάση δεδομένων DrugBank είναι ένα βιοπληροφορικό εργαλείο που συνδυάζει δεδομένα για ένα φάρμακο (δηλαδή χημικές, φαρμακολογικές και φαρμακευτικές πληροφορίες) με πληροφορίες για το στόχο του φαρμάκου (δηλαδή αλληλουχία και μονοπάτι) και η βάση δεδομένων ClinVar συγκεντρώνει πληροφορίες σχετικά με τις σχέσεις μεταξύ των παραλλαγών και την επιρροή τους στον ανθρώπινο οργανισμό.

Τέλος, στην καρτέλα «QC» δίνονται στατιστικά στοιχεία σχετικά με τη ποιότητα της ανάλυσης: το «p-value» που είναι η συνάρτηση των παρατηρούμενων αποτελεσμάτων του δείγματος σε σχέση με ένα στατιστικό μοντέλο το οποίο μετρά πόσο ακραία είναι η παρατήρηση, το «Phred quality score» που μετράει την ποιότητα του αποτελέσματος της αλληλούχησης, το «Coverage» που φαίνεται πόσες φορές έχει διαβαστεί η συγκεκριμένη περιοχή, το «Allele Coverage» που παρουσιάζει πόσες φορές έχει εμφανιστεί το ένα αλληλόμορφο σε σχέση με το αλληλόμορφο αναφοράς, το «Allele Ratio» που είναι η αναλογία του ενός και του άλλου αλληλομόρφου και το «Ref+/Ref-/Var+/Var-» που είναι ο αριθμός των αλληλομόρφων σε κάθε κλώνο.

Με αυτού του τύπου την επεξεργασία εντοπίστηκαν και παρατηρήθηκαν οι σημειακές μεταλλάξεις, οι μικρές προσθήκες και ελλείψεις, αλλά χωρίς περαιτέρω επεξεργασία ήταν αδύνατος ο εντοπισμός των μεγαλύτερων προσθηκών και ελλείψεων.

Το σύστημα της Ion Torrent παρέχει τη δυνατότητα ταυτόχρονης ταυτοποίησης των αλλαγών στον αριθμό αντιγράφων (copy number variation, CNVs), τις μονονουκλεοτιδικές αλλαγές (SNVs) και τις μικρές προσθήκες και ελλείψεις σε ένα δείγμα. Οι CNVs αποτελούν αλλαγές που προκύπτουν από διπλασιασμούς ή ελλείψεις μεγάλων περιοχών του γονιδιώματος. Η ανίχνευση των CNVs γίνεται με τη χρήση ενός αλγορίθμου που ονομάζεται Hidden Markov Model. Ο αλγόριθμος αυτός συγκρίνει τις τιμές που περιγράφουν πόσα amplicons έχουν διαβαστεί στο δείγμα με κάποιο ή κάποια δείγματα ελέγχου. Αυτό συνεπάγεται ότι το δείγμα που θα χαρακτηριστεί ως δείγμα ελέγχου δεν πρέπει να έχει CNVs. Τα δείγματα ελέγχου πρέπει να επιλεγούν προσεκτικά καθώς η ύπαρξη CNVs σε αυτά μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Σε περίπτωση που τα περισσότερα ή όλα τα δείγματα αναφέρονται ως έχοντα CNVs στην ίδια περιοχή, μια πιθανή αιτία είναι ότι το δείγμα ελέγχου έχει CNV στην εν λόγω περιοχή. Εξ ορισμού όλα τα υπονήφια CNVs που εμφανίζουν υψηλότερες βαθμολογίες είναι πιο πιθανό να είναι αληθώς θετικά. Για τα χρωμοσώματα X και Y ο αριθμός των αντιγράφων και η βαθμολογία που καθορίζει αν ένα δοσμένο CNV είναι ακριβές καθορίζεται από το φύλο του



δείγματος ελέγχου. Για παράδειγμα, η αναμενόμενη πλοειδία του *X* για ένα δείγμα ελέγχου αρσενικό είναι 1. Αν το δείγμα δοκιμής έχει επίσης 1 αντίγραφο του *X*, η βαθμολογία που καθορίζει αν ένα δοσμένο CNV είναι ακριβές θα είναι 0, δεδομένου ότι δεν υπάρχει καμία απόδειξη πλοειδίας.

Για να μπορέσουν τα αποτελέσματα να είναι ακριβή ο αλγόριθμος έχει κάποιες απαιτήσεις. Τα amplicons που θα σχεδιαστούν σε ένα panel πρέπει να ξεπερνούν τα 200, καθώς μικρότερα panels δεν έχουν δοκιμαστεί για την ακρίβεια του υπολογισμού των CNVs. Επιπλέον σε ένα panel τα amplicons που παρουσιάζουν CNVs δε πρέπει να ξεπερνούν το 20%. Έτσι, για κάθε γονίδιο που έχει CNVs, θα πρέπει κατά κανόνα να υπάρχουν τουλάχιστον 5 γονίδια στο panel που δεν έχουν. Εάν περισσότερα από 20% των amplicons έχουν CNV, η μεταβολή του αριθμού αντιγράφων μπορεί να ανιχνευθεί αλλά υπάρχει μεγάλη πιθανότητα για λάθος αποτελέσματα. Ένα CNV μπορεί να ανιχνευθεί με μεγαλύτερη ακρίβεια εάν τουλάχιστον 10, και στην ιδανική περίπτωση 20 amplicons το καλύπτουν. Μπορεί να βρεθεί ένα CNV ακόμα και αν καλύπτεται από λιγότερα amplicons, αλλά εάν τα δεδομένα παρουσιάζουν θόρυβο ή αν η κάλυψη είναι χαμηλή, ένα CNV που καλύπτεται από λιγότερα από 10 amplicons μπορεί να χαθεί. Τέλος, για να βελτιωθεί η αξιοπιστία ενός panel όταν γίνεται προσθήκη amplicons στο panel πρέπει οι περιοχές που καλύπτουν αυτά τα amplicons να είναι έξω από το γονίδιο που μελετάται και ιδανικά σε άλλα χρωμοσώματα.

Για τους παραπάνω λόγους στο panel για τη μελέτη του γονιδίου *SERPINC1* προστέθηκαν όλες οι εξωνικές περιοχές του γονιδίου *SERPINC1*, οι ιντρονικές, οι θέσεις σύνδεσης εξονίων – ιντρονίων και ο υποκινητής του γονιδίου. Επιπλέον το panel αυτό σχεδιάστηκε να περιέχει τις κωδικοποιούσες αλληλουχίες και άλλων γονιδίων σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Τα γονίδια αυτά ήταν το *F12*, *SERPINC1*, *A2M*, *SERPINF1*, *SERPINA1*, *SERPINE1*, *SERPINB2*, *ACE*, *XPNPEP1*, *XPNPEP2*, *XPNPEP3*, *BDKRB1*, *BDKRB2*, *PLG*, *KLKB1*, *KLK1*, *KLK3*, *PLAT*, *PLAU*, *C1R*, *C1S*, *MASPI*, *MASP2*, *F2*, *PROC*, *F13A1*, *F13B*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR9*, *HRH1*, *IL5*, *TNF*, *HSP90AA1*, *KLK2*, *ESRRA*, *PER1*, *AR*, *ELANE*, *MPO*, *TPSAB1*, *TPSD1*, *TPSG1*, *KNG1*, *TAC1*, *CPM*, *CPN1*, *PRCP*, *DPP4*, *MME*, *PLAUR*, *F11*, *KRT1* και *C1QBP*. Το νέο αυτό panel είχε 825 amplicons.

Όπως αναφέρθηκε για να γίνει η ανίχνευση των CNVs χρειάζεται η σύγκριση του δείγματος με δείγμα ελέγχου που δεν περιέχει CNVs. Η ιστοσελίδα της Ion Reporter δίνει τη δυνατότητα σύγκρισης του δείγματος με ένα δείγμα ελέγχου (paired CNV analysis), αλλά επίσης επιτρέπει και τη σύγκριση με περισσότερα δείγματα ελέγχου ταυτόχρονα (Baseline CNV analysis). Για να λάβουν χώρα αυτές οι συγκρίσεις πρέπει να δημιουργηθεί μία ροή εργασίας (workflow). Η δημιουργία της ροής εργασίας παρουσιάζεται στο παράρτημα 6.

## B.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στη παρούσα εργασία εξετάσθηκαν 28 δείγματα. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων παρουσιάζονται στο πίνακα 6.

Δείγμα	Τύπος ΗΑΕ	Μετάλλαξη που ανιχνεύτηκε με διαφορετική μέθοδο	Μετάλλαξη που ανιχνεύθηκε με NGS	Περιοχή γονιδίου	Σύγκριση των αποτελεσμάτων των μεθόδων ως προς τις μεταλλάξεις
1	I	g.1768 A>G c.1A>G M1V	g.1768 A>G c.1A>G M1V	Εξώνιο 2	Επαληθεύτηκε
2	I	g.3876G>A c.550G>A G184R	g.3876G>A c.550G>A G184R	Εξώνιο 3	Επαληθεύτηκε
3	I	c.94C>T Gln32X	c.94C>T Gln32X	Εξώνιο 3	Επαληθεύτηκε
4	I	g.5655-56TC>AA c.675-76 TC>AA F225X	g.5655-56TC>AA c.675-76 TC>AA F225X	Εξώνιο 4	Επαληθεύτηκε
5	I	g.9699T>C c.878T>C p.I293T	g.9699T>C c.878T>C p.I293T	Εξώνιο 5	Επαληθεύτηκε
6	I	g.17993C>T c.1420C>T Q474X	g.17993C>T c.1420C>T Q474X	Εξώνιο 8	Επαληθεύτηκε
7	II	g.17971G>A c.1397G>A R466H	g.17971G>A c.1397G>A R466H	Εξώνιο 8	Επαληθεύτηκε
8	I	g.17925insGAACTGAC A_dupl c.1350insGAACTGACA _dupl T450fs [E448-L449- T450_duplication]	g.17925insGAACTG ACA_dupl c.1350insGAACTG ACA_dupl T450fs [E448-L449- T450_duplication]	Εξώνιο 8	Επαληθεύτηκε
9	I	g.9692A>C c.871A>C N291H	g.9692A>C c.871A>C N291H	Εξώνιο 5	Επαληθεύτηκε
10	I	g.3826T>A c.500T>A M167K	g.3826T>A c.500T>A M167K	Εξώνιο 3	Επαληθεύτηκε
11	I	Ala185Pro	Ala185Pro	Εξώνιο 4	Δεν επαληθεύτηκε

**Πίνακας 6:** Αποτελέσματα πειραμάτων.

Δείγμα	Τύπος	Μετάλλαξη που	Μετάλλαξη που	Περιοχή	Σύγκριση
--------	-------	---------------	---------------	---------	----------

HAE		ανιχνεύτηκε με διαφορετική μέθοδο	ανιχνεύθηκε με NGS	γονιδίου	των αποτελεσμάτων των μεθόδων ως προς τις μεταλλάξεις
12	I	g.15289delA c.1106delA D369fs	g.15289delA c.1106delA D369fs	Εξώνιο 7	Επαληθεύτηκε
13	II	g.17970C>T c.1396C>T R466C	g.17970C>T c.1396C>T R466C	Εξώνιο 8	Επαληθεύτηκε
14	I	g.5568-71DelATCC c.586-589DelATCC I196fs	c.585C>G p.Ser195Arg	Εξώνιο 4	Δεν επαληθεύτηκε
15	I	Έλλειψη του εξωνίου 1-8	Έλλειψη του εξωνίου 1-8	Εξώνιο 1- 8	Επαληθεύτηκε
16	I	Έλλειψη του εξωνίου 4	Έλλειψη του εξωνίου 4	Εξώνιο 4	Επαληθεύτηκε
17	I	Έλλειψη του εξωνίου 7	Έλλειψη του εξωνίου 7	Εξώνιο 7	Επαληθεύτηκε
18	I	g.3655-67del13bp c.350-62del13bp P110fs	g.365567del13bp c.350-62del13bp P110fs	Εξώνιο 3	Επαληθεύτηκε
19	I	g.3704ins20bp c. 378ins20bp P126fs	g.3704ins20bp c. 378ins20bp P126fs	Εξώνιο 3	Επαληθεύτηκε
20	I	Έλλειψη εξωνίου 3 και 4	Έλλειψη εξωνίου 3 και 4	Εξώνιο 3 και 4	Επαληθεύτηκε
21	I	Μεγάλη προσθήκη στο εξώνιο 5	g.1769 T>G c.2T>G M1R	Εξώνιο 5	Δεν επαληθεύτηκε
22	I	p.Trp299Ter c.896G>A	p.Trp299Ter c.896G>A	Εξώνιο 6	Επαληθεύτηκε

**Πίνακας 6:** (συνέχεια)

Δείγμα	Τύπος HAE	Μετάλλαξη που ανιχνεύτηκε με διαφορετική μέθοδο	Μετάλλαξη που ανιχνεύθηκε με NGS	Περιοχή γονιδίου	Σύγκριση των αποτελεσμάτων των μεθόδων ως προς τις μεταλλάξεις
23	I	g.15370T>C c.1187T>C L396P	g.15370T>C c.1187T>C L396P	Εξώνιο 7	Επαληθεύτηκε
24	I	g.15219C>T c.1036C>T Q346X	g.15219C>T c.1036C>T Q346X	Εξώνιο 7	Επαληθεύτηκε
25	I	g.9923T>C c.908T>C F303S	g.9923T>C c.908T>C F303S	Εξώνιο 6	Επαληθεύτηκε
26	I	g.1769G>A c.1A>C M1L	g.1769G>A c.1A>C M1L	Εξώνιο 2	Επαληθεύτηκε
27	I	g.10045G>A c.1029+1G>A (splice defect) - No novel	g.10045G>A c.1029+1G>A	Ιντρόνιο 6	Επαληθεύτηκε

**Πίνακας 6:** (συνέχεια)

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση των CNVs για τα δείγματα 15, 16, 17, 20 και 21 εμφανίζονται στο πίνακα 7. Στην ανάλυση για την εύρεση των CNVs υποβλήθηκαν τέσσερα δείγματα που είχαν ως ταυτοποιημένες μεταλλάξεις μεγάλες ελλείψεις και ένα δείγμα για το οποίο η αρχική τυποποίηση ήταν μεγάλη προσθήκη στο εξώνιο 5. Όπως αναλύθηκε στις μεθόδους, η ανίχνευση των CNVs γίνεται με τη χρήση του αλγορίθμου Hidden Markov Model, ο οποίος συγκρίνει τις τιμές που περιγράφουν πόσα amplicons έχουν διαβαστεί στο δείγμα με κάποιο ή κάποια δείγματα ελέγχου, τα οποία δεν παρουσιάζουν CNVs. Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν για την Ανάλυση 1 και 2 δύο διαφορετικά δείγματα, τα οποία είχαν μόνο σημειακές μεταλλάξεις (Paired CNV analysis) και στην Ανάλυση 3 δέκα διαφορετικά δείγματα, τα οποία είχαν μόνο σημειακές μεταλλάξεις (Baseline CNV analysis).

Η ανάλυση 1 έδωσε ακριβές αποτέλεσμα στις 3 από τις 5 αναλύσεις. Πιο συγκεκριμένα, αναγνώρισε ορθώς τις 2 από τις 4 ελλείψεις, ενώ για τις άλλες 3 προσδιορίστηκε μεγαλύτερη βλάβη από αυτήν που είχε προηγουμένως τυποποιηθεί. Στη περίπτωση της προσθήκης δεν αναγνωρίστηκε CNV.

Η ανάλυση 2 έδωσε ακριβές αποτέλεσμα στις 4/4 μεγάλες ελλείψεις, ενώ για το δείγμα 21 αναγνωρίστηκε έλλειψη ολόκληρου του γονιδίου.

Η ανάλυση 3, στην οποία χρησιμοποιούνται δέκα δείγματα ελέγχου έδωσε ακριβές αποτέλεσμα στις 4/5 αναλύσεις, ενώ για το δείγμα 17 κατέδειξε απουσία ολόκληρου το χρωμοσώματος 11 (συμπεριλαμβανομένου και του γονιδίου *SERPINC1*).

Δείγμα	Ανάλυση 1	Ανάλυση 2	Ανάλυση 3	Χαρακτηρισμένες μεταλλάξεις
15	Έλλειψη των εξονίων 1-8 [17.645kb (57364831-57382476)]	Έλλειψη των εξονίων 1-8 [17.645kb (57364831-57382476)]	Έλλειψη των εξονίων 1-8 [17.645kb (57364831-57382476)]	Έλλειψη των εξονίων 1-8
16	Έλλειψη του εξωνίου 4 [1.026kb (57368904-57369930)]	Έλλειψη του εξωνίου 4 [1.026kb (57368904-57369930)]	Έλλειψη του εξωνίου 4 [2.095 kb (57367835-57369930)]	Έλλειψη του εξωνίου 4
17	Έλλειψη ολόκληρου του γονιδίου [17.645kb (57364831-57380190)]	Έλλειψη του εξωνίου 7 [1.48kb (57378710-57380190)]	Έλλειψη χρωμοσώματος 11	Έλλειψη του εξωνίου 7
20	Έλλειψη εξονίων 1με 4 [5.099kb (57364831-57369930)]	Έλλειψη των εξονίων 3 και 4 [3.305kb (57366421-57369726)]	Έλλειψη των εξονίων 3 και 4 [3.305kb (57366421-57369726)]	Έλλειψη των εξονίων 3 και 4
21	Κανένα CNV	Έλλειψη εξωνίου 1-8 [17.645kb (57364831-57382476)]	Κανένα CNV	Λάθος αρχική υπόθεση για προσθήκη στο εξώνιο 5- g.1769T>G c.2T>G M1R

**Πίνακας 7:** Αποτελέσματα από την ανάλυση των CNVs.

## B.5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### Σύγκριση των δύο σχεδιασμένων panel για τη μελέτη του *SERPING1*

Για να γίνει αλληλούχηση του γονιδίου *SERPING1* σχεδιάστηκαν δύο panels. Το πρώτο panel σχεδιάστηκε να περιέχει όλο το γονίδιο *SERPING1* και τις ιντρονικές και τις εξωνικές περιοχές καθώς και έναν μεγάλο αριθμό βάσεων πριν και μετά από το γονίδιο. Ο αριθμός των amplicons στο συγκεκριμένο panel ήταν 121. Παρόλο που σχεδιάστηκε να περιέχει όλο το γονίδιο *SERPING1* παρατηρήθηκε αδυναμία αλληλούχησης ενός μεγάλου μέρους του εξωνίου 4 (εικ.34). Λόγω του ότι η μελέτη στόχευε στην ανάλυση των μεταλλάξεων όλων των εξωνικών περιοχών του γονιδίου κρίθηκε αναγκαίο να σχεδιαστεί εκ νέου το panel. Το νέο αυτό panel σχεδιάστηκε ώστε να περιέχει πράγματι όλες τις εξωνικές περιοχές του γονιδίου *SERPING1*, τις ιντρονικές, τις θέσεις σύνδεσης εξωνίων –ιντρονίων και τον υποκινητή του γονιδίου. Επιπλέον, το panel αυτό περιέχει τις κωδικοποιούσες αλληλουχίες και άλλων γονιδίων σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Τα γονίδια αυτά είναι το *F12*, *SERPINC1*, *A2M*, *SERPINF1*, *SERPINA1*, *SERPINE1*, *SERPINB2*, *ACE*, *XPNPEP1*, *XPNPEP2*, *XPNPEP3*, *BDKRB1*, *BDKRB2*, *PLG*, *KLKB1*, *KLK1*, *KLK3*, *PLAT*, *PLAU*, *C1R*, *C1S*, *MASP1*, *MASP2*, *F2*, *PROC*, *F13A1*, *F13B*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR9*, *HRH1*, *IL5*, *TNF*, *HSP90AA1*, *KLK2*, *ESRRA*, *PER1*, *AR*, *ELANE*, *MPO*, *TPSAB1*, *TPSD1*, *TPSG1*, *KNK1*, *TAC1*, *CPM*, *CPN1*, *PRCP*, *DPP4*, *MME*, *PLAUR*, *F11*, *KRT1* και *CIQBP*. Το νέο αυτό panel περιέχει 825 amplicons. Ο σκοπός της προσθήκης των επιπλέον γονιδίων είναι ότι λαμβάνουν μέρος στο μεταβολισμό ή τη λειτουργία της βραδυκινίνης και θα αποτελέσουν αντικείμενο παραπέρα γενετικής μελέτης της νόσου. Επιπρόσθετα με τη προσθήκη των γονιδίων αυτών στο panel έγινε βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων στην περίπτωση παρουσίας CNVs, ενώ ο αλγόριθμος που τα ανιχνεύει μπορεί να δώσει πιο αξιόπιστα αποτελέσματα για panels μεγαλύτερα των 200 amplicons. Επιπλέον, η χρήση πολλών διαφορετικών γονιδίων σε διαφορετικά χρωμοσώματα μειώνει την πιθανότητα περισσότερα από το 20% των amplicons σε ένα panel να έχουν CNVs. Εάν παρουσιάζουν CNVs περισσότερα από το 20% των amplicons ο αλγόριθμος μπορεί να δώσει αποτέλεσμα αλλά θα είναι λανθασμένο.

Η αξιολόγηση των μεταλλάξεων στα γονίδια που προστέθηκαν στο νέο panel εκτός του γονιδίου *SERPING1* δεν αποτελούν τμήμα της παρούσας μελέτης και δεν θα σχολιαστούν περαιτέρω.



**Εικόνα 34:** Είναι εμφανής η αδυναμία διαβάσματος μέρους του εξωνίου 4 του γονιδίου *SERPING1*, καθώς κανένα amplicon δεν καλύπτει τη συγκεκριμένη περιοχή.

### Σύγκριση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν με άλλες μεθόδους και με Ion Torrent NGS

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα 6 το 89% των δειγμάτων που εξετάστηκαν με NGS έδωσαν την μετάλλαξη που είχε ανιχνευτεί με άλλη μέθοδο (Sanger, MLPA, Long Range PCR).

Τα δείγματα που δεν επαληθεύτηκαν οι χαρακτηρισμένες μεταλλάξεις ήταν 3. Ασυμφωνία παρατηρήθηκε στα δείγματα 11, 14 και 21 που αναλύονται στη συνέχεια.

Το δείγμα 11 είχε αρχικά χαρακτηριστεί πως φέρει σημειακή μετάλλαξη p.Ala185Pro, η οποία δεν επισημάνθηκε από το λογισμικό ανάλυσης ion reporter. Ωστόσο, ανάλυση των πρωτογενών δεδομένων στο πρόγραμμα IGV κατέδειξε παρουσία της μετάλλαξης στον ένα κλώνο (εικ.35). Η επιλεκτική ενίσχυση της παραλλαγής από τον ένα κλώνο είχε σαν αποτέλεσμα τον αποκλεισμό της αναφοράς της ως μετάλλαξη και την επισήμανση της ως θόρυβο. Για να αναδειχθεί η μετάλλαξη στη λίστα με τις αποδεκτές μεταλλάξεις του διακομιστή ήταν αναγκαία η τροποποίηση στον αλγόριθμο ανάλυσης Variant Caller της παραμέτρου «snr strand bias» από 0,98 σε 1. Ωστόσο, αυτή η διορθωτική ενέργεια δεν μπορεί να εφαρμοστεί στο σύνολο των δειγμάτων, καθώς έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Εναλλακτικά, θα πρέπει να γίνεται οπτική επιθεώρηση των πρωτογενών δεδομένων στο πρόγραμμα IGV από το χρήστη στις περιοχές που επισημαίνεται θόρυβος ώστε να διαπιστωθεί αν όντως αντιστοιχεί σε θόρυβο ή ψευδώς αρνητική μετάλλαξη.

Το δείγμα 14 είχε αρχικά χαρακτηριστεί πως φέρει έλλειψη 4 βάσεων (g.5568-71DelATCC, c.586-589DelATCC, I196fs), η οποία αναγνωρίστηκε με NGS ως σημειακή μετάλλαξη αντικατάστασης βάσης (c.585C>G p.Ser195Arg). Ανάλυση των πρωτογενών δεδομένων στο πρόγραμμα IGV κατέδειξε παρουσία της έλλειψης των 4 νουκλεοτιδίων (ATCC) σε συνδυασμό με σημειακή μετάλλαξη αντικατάστασης C>G (εικ.36). Επανεξετάζοντας τα δεδομένα της Sanger επιβεβαιώθηκε ο συνδυασμός έλλειψης και σημειακής μετάλλαξης αντικατάστασης βάσης. Επιχειρήθηκε προσπάθεια αλλαγής των παραμέτρων στον αλγόριθμο ανάλυσης Variant Caller χωρίς αλλαγή του αποτελέσματος. Καθώς φαίνεται ο αλγόριθμος αδυνατεί να αναφέρει στις αποδεκτές μεταλλάξεις τον συνδυασμό των δύο βλαβών. Η αδυναμία του αλγορίθμου γνωστοποιήθηκε στην κατασκευάστρια εταιρεία και έχουν αποσταλεί τα πρωτογενή δεδομένα ώστε να διερευνηθεί περαιτέρω και να προταθεί διορθωτική ενέργεια.

Στο δείγμα 21 είχε εντοπισθεί αρχικά ως παθογονική βλάβη μεγάλη προσθήκη στο εξόνιο 5. Από την ανάλυση με την μέθοδο Ion Torrent NGS ανιχνεύθηκε ετερόζυγη σημειακή μετάλλαξη που αλλάζει το κωδικόνιο έναρξης του γονιδίου *SERPINI1* (g.1769 T>G, c.2T>G, M1R) (εικ.37). Η ύπαρξη της σημειακής μετάλλαξης c.2T> G εξακριβώθηκε με τη μέθοδο Sanger, ενώ δεν διαπιστώθηκε μεγάλη βλάβη στο εξόνιο 5 μετά από επανεξέταση των δεδομένων της Long Range PCR και της MLPA (εικ.38). Η ανάλυση των CNVs στο δείγμα 21 πραγματοποιήθηκε με τρεις τύπους ανάλυσης και ήταν ασαφής, καθώς στις δύο από τις τρεις περιπτώσεις το αποτέλεσμα ήταν απουσία μεγάλης βλάβης, ενώ στην τρίτη ανάλυση προέκυψε έλλειψη όλου του γονιδίου.

### Ανάλυση CNVs

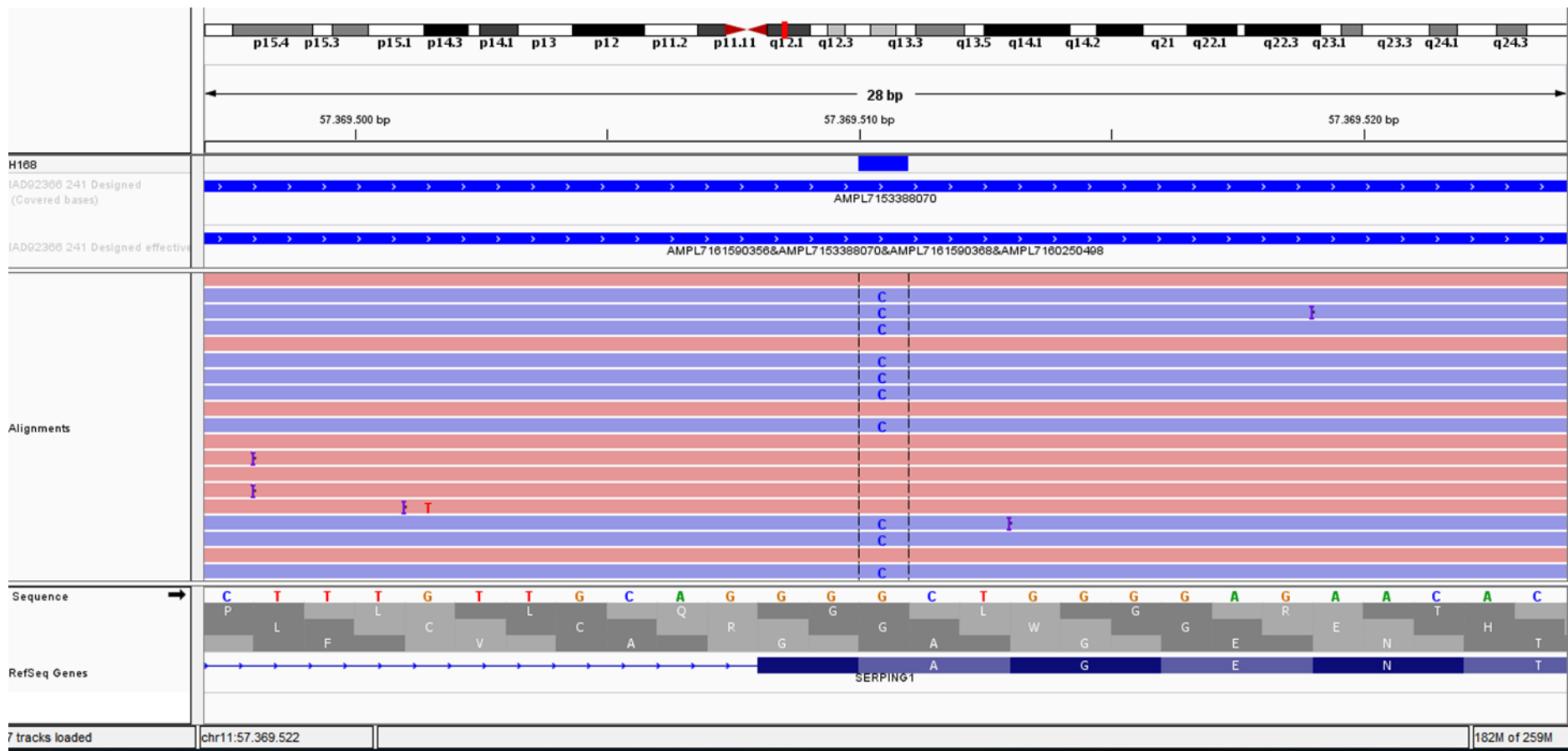
Στην ανάλυση για την εύρεση των CNVs υποβλήθηκαν τέσσερα δείγματα που είχαν ως ταυτοποιημένες μεταλλάξεις μεγάλες ελλείψεις και ένα δείγμα για το οποίο η αρχική τυποποίηση ήταν μεγάλη προσθήκη στο εξόνιο 5 (πιν.7). Όπως αναλύθηκε στις μεθόδους, η ανίχνευση των CNVs γίνεται με τη χρήση του αλγορίθμου Hidden Markov Model, ο οποίος συγκρίνει τις τιμές που περιγράφουν πόσα amplicons έχουν διαβαστεί στο δείγμα με κάποιο ή κάποια δείγματα ελέγχου, τα οποία δεν παρουσιάζουν CNVs. Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν για την Ανάλυση 1 και 2 δύο διαφορετικά δείγματα, τα οποία είχαν μόνο σημειακές μεταλλάξεις (Paired



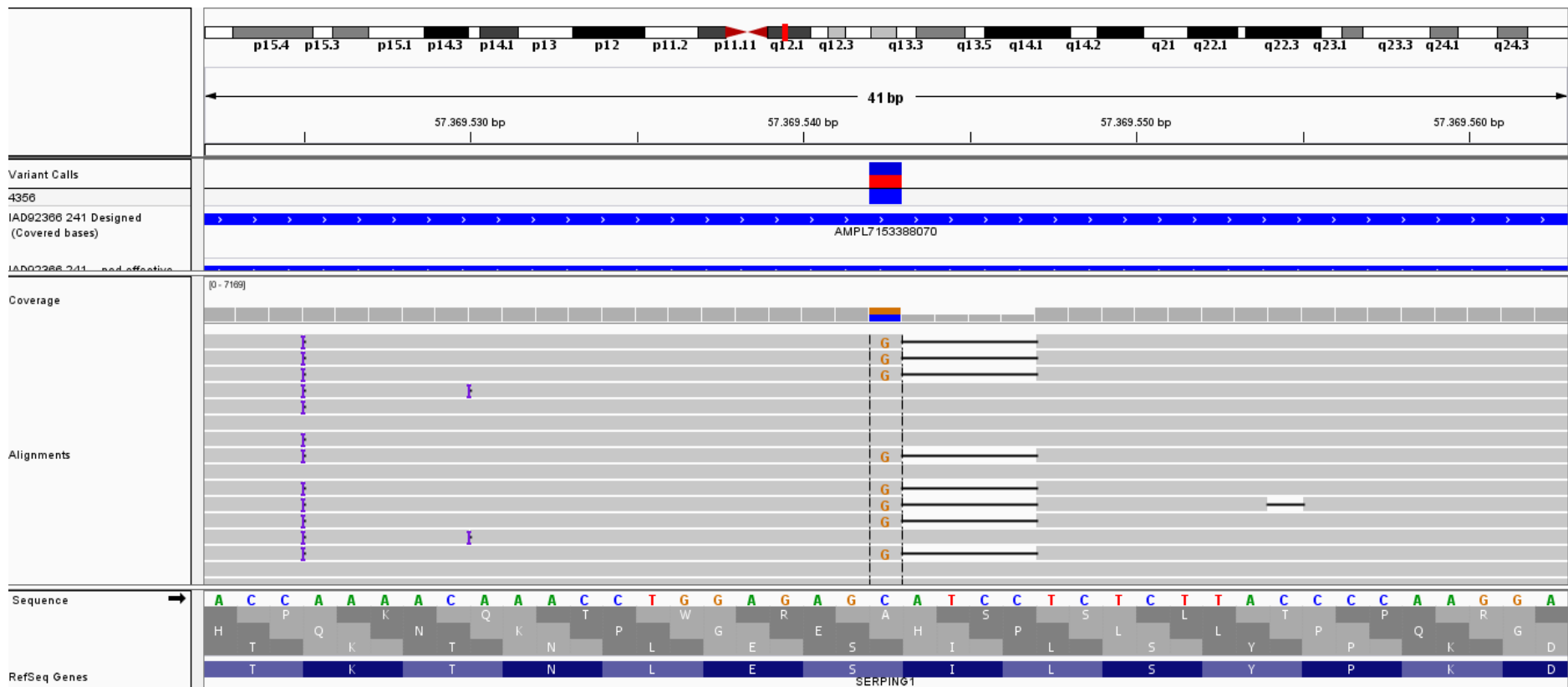
CNV analysis) και στην Ανάλυση 3 δέκα διαφορετικά δείγματα, τα οποία είχαν μόνο σημειακές μεταλλάξεις (Baseline CNV analysis). Τα αποτελέσματα των τριών αναλύσεων παρουσιάζονται στον πίνακα 7.

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα και των τριών αναλύσεων προκύπτει πως η ευαισθησία της μεθόδου δεν είναι ικανοποιητική για καμία από τις τρεις αναλύσεις. Η επιλογή του δείγματος/ δειγμάτων ελέγχου φαίνεται πως επηρεάζει τα αποτελέσματα της ανάλυσης οδηγώντας σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Για να αποφευχθεί, λοιπόν, η μεταβλητότητα που πιθανώς οφείλεται στο δείγμα ελέγχου ή/και στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του κάθε διαφορετικού πειράματος (ομοιομορφία- uniformity, κάλυψη- coverage, βάθος ανάλυσης- read depth) προτείνεται η χρήση πρότυπου δείγματος DNA, το οποίο θα αλληλουχηθεί σε διαφορετικά πειράματα. Το πρότυπο DNA εφόσον θα χρησιμοποιηθεί ως δείγμα ελέγχου δεν πρέπει να διαθέτει CNVs και να είναι κατά προτίμηση αρσενικό ώστε να μπορεί να αναδείξει και μεγάλες βλάβες στο χρωμόσωμα X. Το πρότυπο DNA μπορεί στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί σε κάθε πείραμα ως δείγμα ελέγχου σε ανάλυση κατά ζεύγη (Paired CNV analysis) ή/και να δοκιμαστεί σε δέκα διαφορετικά πειράματα ώστε να χρησιμοποιηθεί ως Baseline CNV analysis. Η δοκιμή αυτών των δύο τύπων αναλύσεων είναι απαραίτητη για να διαπιστωθεί εάν η CNV ανάλυση με NGS μπορεί να αντικαταστήσει τις υπάρχουσες τεχνικές ή να είναι μία μέθοδος αρχικής τυποποίησης μεγάλων βλαβών συμπληρωματική της Long Range PCR και της μεθόδου MLPA.

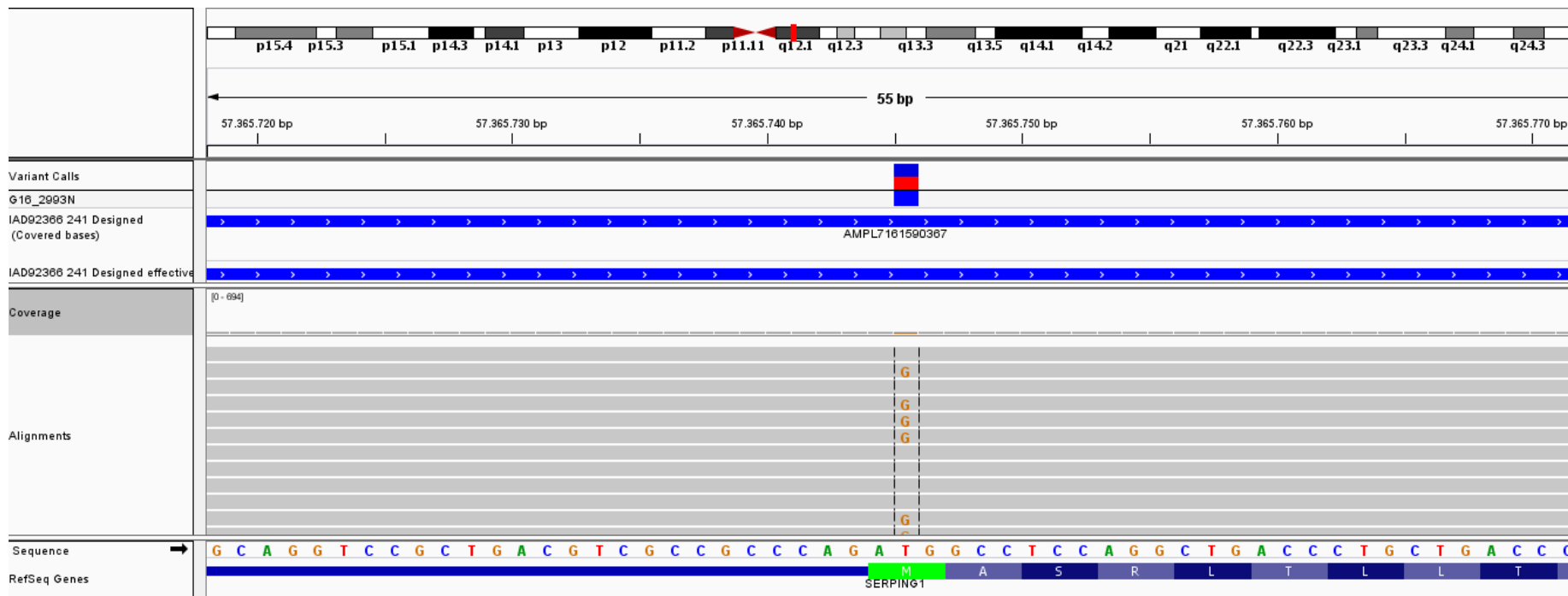
Συμπερασματικά, η τεχνολογία του NGS είναι μία επαναστατική μέθοδος αλληλούχησης στην οποία λαμβάνουν χώρα μεγαλύτερος αριθμός αντιδράσεων ταυτόχρονα, μεγαλύτερων συνολικά τμημάτων DNA σε μικρότερο χρονικό διάστημα και με μεγαλύτερη ταχύτητα. Στην παρούσα μελέτη επιχειρήθηκε η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου Αλληλούχησης Νέας Γενεάς για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων και μεγάλων βλαβών στο γονίδιο *SERPING1*, για να μειωθεί ο χρόνος και το κόστος τυποποίησης των γενετικών βλαβών σε ασθενείς με κληρονομικό αγγειοίδημα. Το πρωτόκολλο το οποίο αναπτύχθηκε χρήζει περαιτέρω βελτιώσεων για να μπορέσουν να καλυφθούν όλες οι γνωστές μεταλλάξεις του γονιδίου *SERPING1* που οδηγούν στο κληρονομικό αγγειοίδημα και είναι απαραίτητο να ελεγχθούν όλα τα διαθέσιμα δείγματα με τις χαρακτηρισμένες μεταλλάξεις στο συγκεκριμένο γονίδιο. Με την ενσωμάτωση των βελτιώσεων στις μικρές και μεγάλες βλάβες το πρωτόκολλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη ταχύτερη και σε μεγάλη κλίμακα τυποποίηση ασθενών με κληρονομικό αγγειοίδημα και των συγγενών τους.



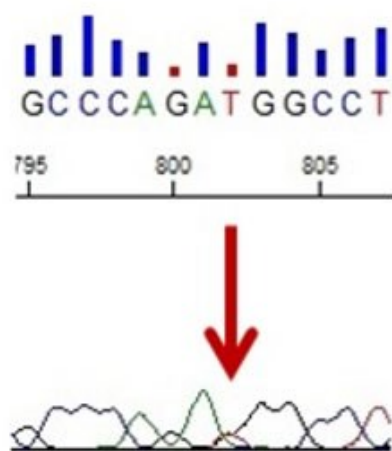
**Εικόνα 35:** Το δείγμα 11 και η εμφανής μετάλλαξη στο αρχείο IGV η οποία εμφανίζεται στον έναν κλώνο (μωβ γραμμές).



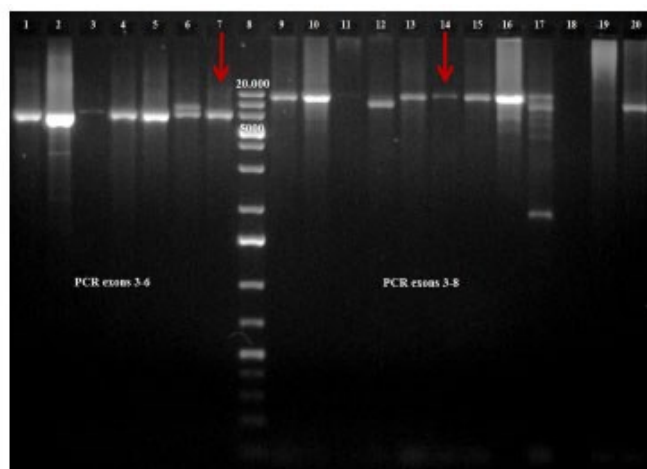
**Εικόνα 36:** Το δείγμα 14. Στο IGV είναι εμφανής και η έλλειψη και η σημειακή μετάλλαξη.



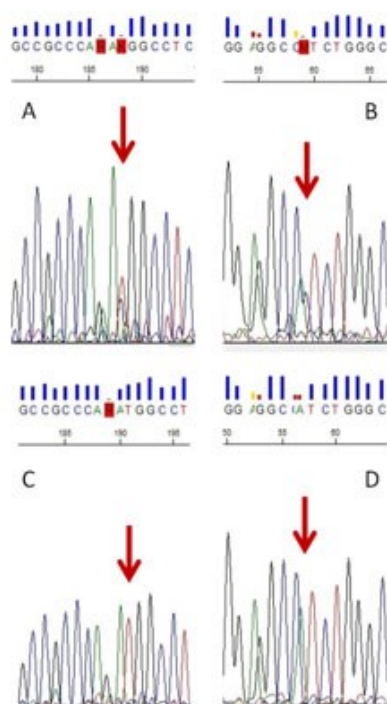
**Εικόνα 37:** Το δείγμα 21 που παρουσιάζει σημειακή μετάλλαξη(T>G).



Αλληλούχηση με Sanger του δείγματος 21 από προηγούμενη μελέτη. Το κόκκινο βέλος δείχνει τη μετάλλαξη c.2T>G.



Αποτελέσματα της Long Range PCR. Το κόκκινο βέλος δείχνει τα amplicons του δείγματος 21 για τα εξώνια 3-6 και 3-8. Δεν φαίνεται η ύπαρξη μεγάλων βλαβών.



Αλληλούχηση Sanger του δείγματος 21 και δείγματος ελέγχου

A) Δείγμα 21 (Forward)

B) Δείγμα 21 (Reverse)

C) Δείγμα Ελέγχου (Forward)

D) Δείγμα Ελέγχου (Reverse)

**Εικόνα 38:** Αποτελέσματα αλληλούχησης Sanger και αποτελέσματα από Long Range PCR για το δείγμα 21.

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

---

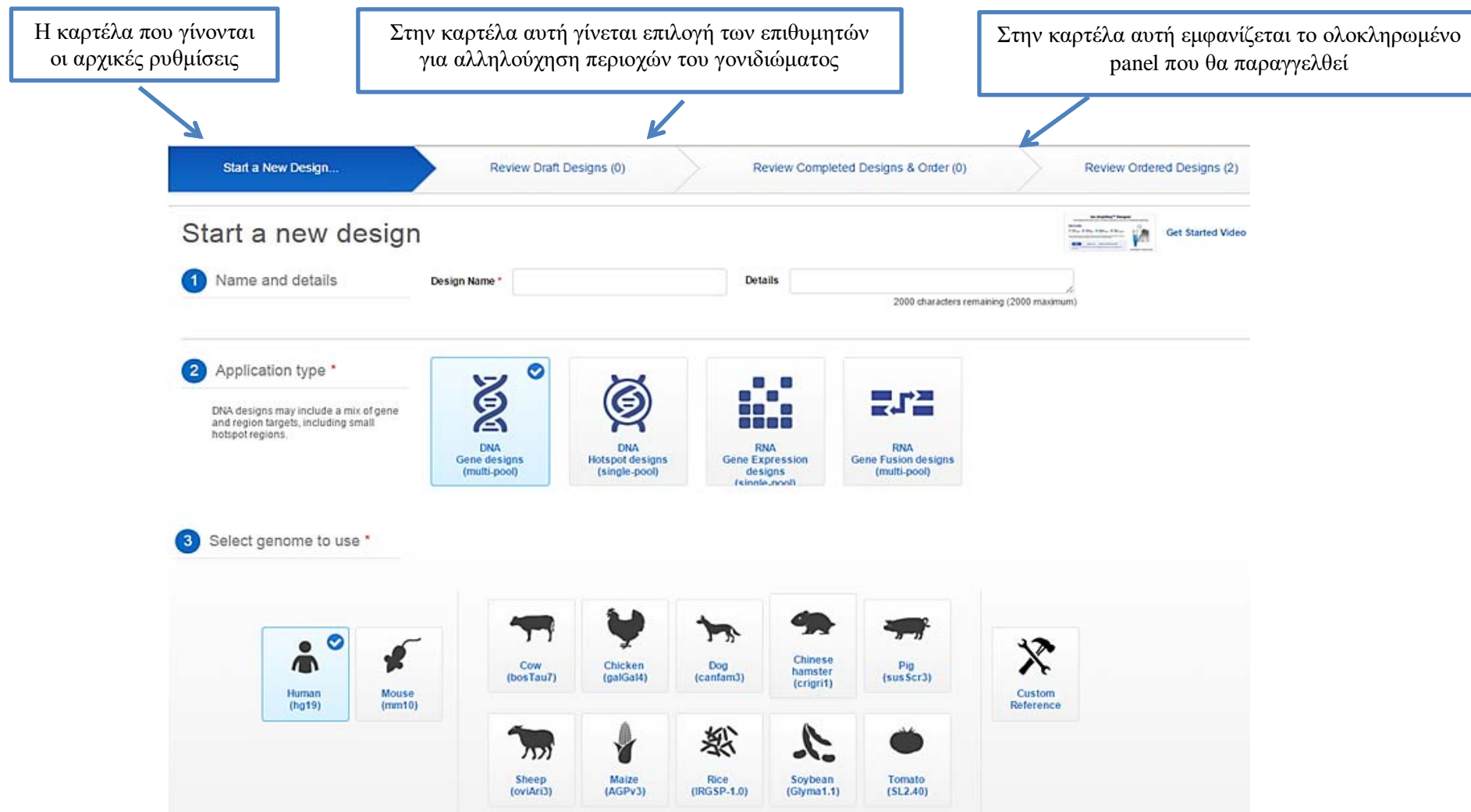
## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

### ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ PANEL ΣΤΗΝ ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΑ ΤΗΣ AMPLISEQ

Για να σχεδιαστεί το panel το οποίο θα χρησιμοποιηθεί στην αλληλούχηση του DNA με τη χρήση του Ion PGM™ System γίνεται χρήση της ιστοσελίδας Ampliseq.com.

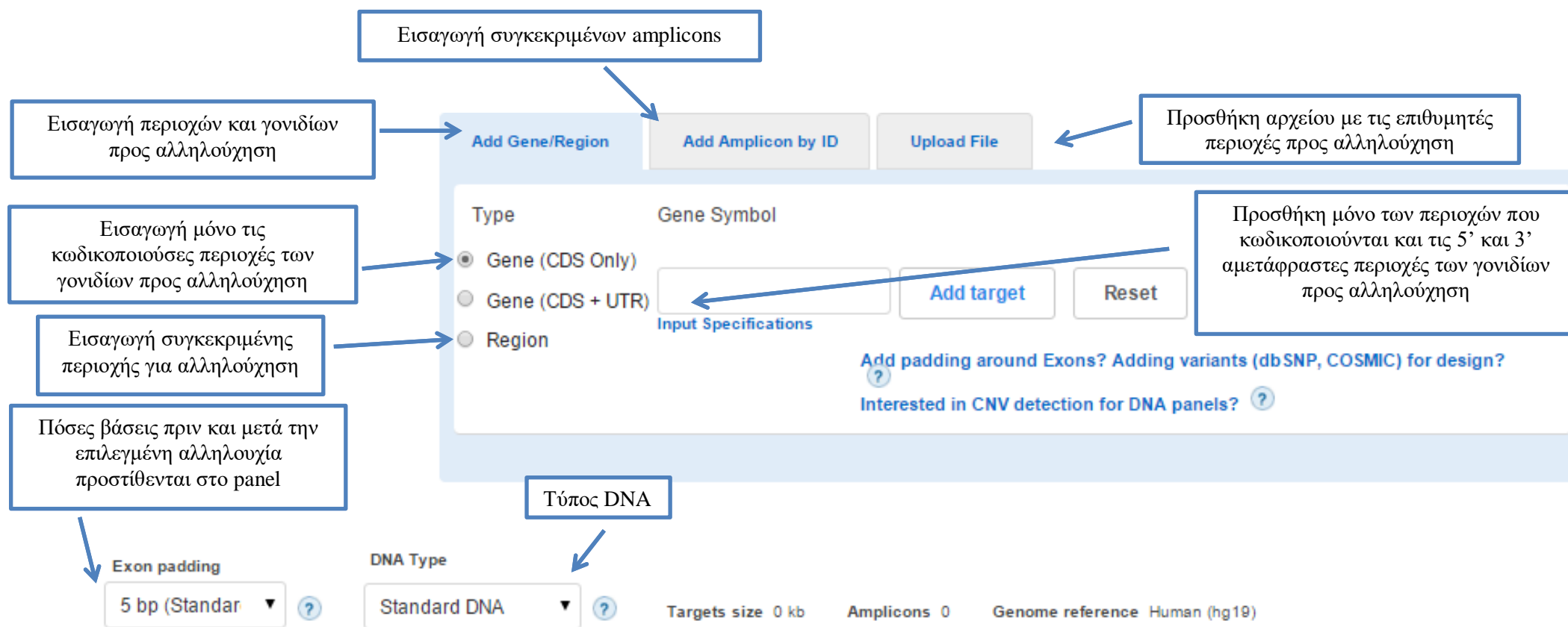
Τα βήματα που ακολουθούνται στην ιστοσελίδα αυτή είναι:

- δημιουργία λογαριασμού
- στην καρτέλα «Start a New Design» συμπλήρωση του ονόματος του panel στο πεδίο «Name and details» (εικ.39), επιλογή του τύπου αλληλούχησης «DNA Gene designs (multi-pool)» στο πεδίο «Application Type». Με την επιλογή αυτή το panel θα περιλαμβάνει ένα συνδυασμό γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων των περιοχών με υψηλή πιθανότητα μεταλλαξιγένεσης. Τέλος, στο πεδίο «Select genome to use» γίνεται επιλογή του είδους του οργανισμού που θα μελετηθεί.
- στην καρτέλα «Review Draft Design» επιλέγονται γονίδια ή περιοχές γονιδίων, συγκεκριμένα amplicons ή εισάγεται αρχείο που να περιέχει τις περιοχές και γονίδια που ζητούνται να αλληλουχηθούν (εικ. 40). Επιπρόσθετα, σε αυτή τη καρτέλα παρέχεται η δυνατότητα επιλογής κάποιου αριθμού βάσεων πριν και μετά από τις μεταγραφόμενες περιοχές ώστε να συμπεριληφθούν στο panel (η επιλογή αυτή γίνεται από το exon padding) και το είδος του DNA, που μπορεί να είναι κανονικό (standard), DNA επεξεργασμένο με παραφίνη (FFPE DNA) και εμβρυικό DNA ελεύθερων κυττάρων (cfDNA).
- στην καρτέλα «Review Completed Designs & Orders» παρουσιάζεται το σχεδιασμένο panel που περιλαμβάνει τις εξής πληροφορίες: τα πιθανά panels, τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την ειδικότητα της αντίδρασης (υψηλή, μέτρια, χαμηλή), τον τύπο του DNA (κανονικό DNA, εμβρυικό DNA ελεύθερων κυττάρων και DNA επεξεργασμένο σε παραφίνη), το μέγεθος και τον αριθμό των amplicons, τα μηχανήματα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, τον αριθμό των ομάδων εκκινήτων, τις βάσεις που χάνονται και τέλος το πόσο της εκατό της αλληλουχίας που ζητήθηκε μπορεί να αλληλουχηθεί με το συγκεκριμένο panel (coverage %).
- στην καρτέλα «Review Ordered Designs» φαίνεται το panel που θα υλοποιηθεί.



**Εικόνα 39:** Η καρτέλα «Start New Design» για το σχεδιασμό του panel στην ιστοσελίδα της Ampliseq.com.





**Εικόνα 40:** Η καρτέλα «Review Draft Design».

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

### ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ

#### Ενίσχυση του γονιδίου με PCR

- Αρχικά παρασκευάζεται 1 μείγμα για κάθε ομάδα εκκινητών που χρησιμοποιείται. Στην περίπτωση της αλληλούχησης του γονιδίου *SERPING1* υπάρχουν 2 ομάδες εκκινητών και το μείγμα που παρασκευάζεται περιέχει τα ακόλουθα :

Αντιδραστήρια που θα προστεθούν στο μείγμα	Ποσότητα των αντιδραστηρίων (μl)
5x Ion Ampliseq HiFi μείγμα	2 μl
2x Ampliseq ομάδα εκκινητών	5 μl
Νερό χωρίς νουκλεάση	1 μl
Σύνολο	8 μl

Τα αντιδραστήρια αυτά προστίθενται ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων που θα τοποθετηθούν σε κάθε αντίδραση. Από το μείγμα αυτό προσθέτονται 8 μl σε κάθε φρεάτιο. Στη συνέχεια προσθέτονται 2 μl gDNA (5ng/μl) σε κάθε φρεάτιο του πιάτου που προστέθηκε το μείγμα.

- Αφού το πιάτο καλυφθεί με μεμβράνη γίνεται περιδίνηση και κατακρήμνιση στη φυγόκεντρο και τοποθετείται στο θερμοκυκλοποιητή στις ακόλουθες συνθήκες:

Στάδιο	Βήμα	Θερμοκρασία	Χρόνος
Διατήρηση	Ενεργοποίηση Ενζύμου	99 °C	2 min
15 κύκλοι	Αποδιάταξη	99 °C	15 sec
	Υβριδισμός	60 °C	4 min
Διατήρηση	-	10 °C	-

Στο τέλος του σταδίου αυτού τα προϊόντα της PCR μπορούν να αποθηκευτούν στους 10 °C για 24h. Για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα πρέπει να γίνει αποθήκευση τους στους -20 °C.

#### Πέψη εκκινητών

- Γίνεται αφαίρεση της μεμβράνης και ανάμειξη των διαλυμάτων με τα διαφορετικά ζεύγη εκκινητών.
- Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη 2μl του αντιδραστηρίου Fura σε κάθε ένα φρεάτιο και πιπετάρισμα. Το αντιδραστήριο Fura είναι το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την πέψη των εκκινητών.

- Στο πιάτο τοποθετείται μεμβράνη, γίνεται περιδίνηση, κατακρήμνιση στη φυγόκεντρο και τοποθετείται στο θερμοκυκλοποιητή στο ακόλουθο πρόγραμμα:

Θερμοκρασία	Χρόνος
50 °C	10 min
55 °C	10 min
60 °C	20 min
10 °C	Διατήρηση (μέχρι 1 ώρα)

#### Πρόσδεση των προσαρμογέων στα amplicons

Για να γίνει η πρόσδεση των προσαρμογέων στα amplicons πρέπει να γίνει αραίωση τους και συνδυασμός τους με τους κωδικούς ιχνηλασιμότητας. Πρέπει να σημειωθεί ότι εάν ένα panel έχει δύο ή περισσότερες ομάδες εκκινητών, ο ίδιος κωδικός ιχνηλασιμότητας θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί για όλες τις αντιδράσεις σε ένα δείγμα.

- Λαμβάνει χώρα αραίωση 1 :4 για κάθε κωδικό ιχνηλασιμότητας προσθέτοντας τα παρακάτω αντιδραστήρια:

Συστατικό	Ποσότητα
Ion P1 προσαρμογέας	2 $\mu$ l
Ion Xpress κωδικός ιχνηλασιμότητας X1	2 $\mu$ l
Νερό χωρίς νουκλεάση	4 $\mu$ l
Σύνολο	8 $\mu$ l

Εάν υπάρχει ορατό ίζημα στο Switch Solution γίνεται περιδίνηση ή πιπετάρισμα και προσθήκη σε κάθε φρεάτιο τα ακόλουθα διαλύματα

Συστατικό	Ποσότητα
Αντιδραστήριο Switch	4 $\mu$ l
Αραιωμένο μείγμα κωδικών ιχνηλασιμότητας με προσαρμογείς	2 $\mu$ l
Σύνολο	6 $\mu$ l

- 2 µl DNA λιγάση προστίθεται σε κάθε φρεάτιο. Το ένζυμο DNA λιγάση ενώνει τους αραιωμένους κωδικούς ιχνηλασιμότητας και τους προσαρμογείς με το DNA.
- Το πιάτο κλείνει με μεμβράνη, γίνεται περιδίνηση και κατακρήμνιση. Στη συνέχεια, τοποθετείται στον θερμοκυκλοποιητή και ακολουθείται το παρακάτω πρόγραμμα.

Θερμοκρασία	Χρόνος
22 °C	30 min
72 °C	10 min
10 °C	Διατήρηση (μέχρι 1 ώρα)

Τα δείγματα μπορούν να φυλαχτούν στους -20° C.

#### Καθαρισμός της βιβλιοθήκης

Αρχικά γίνεται προετοιμασία 70% αιθανόλης. Για κάθε δείγμα προσθέτουμε 230 µl αιθανόλης και 100 µl νερού χωρίς νουκλεάση.

- Η μεμβράνη αφαιρείται και προστίθεται σε κάθε φρεάτιο 45 µl του αντιδραστηρίου Agencourt AMPure XP και γίνεται πιπετάρισμα τουλάχιστον 5 φορές μέχρι να διαλυθεί πλήρως το εναιώρημα σφαιριδίων με το DNA.
- Το διάλυμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.
- Τοποθετείται το πιάτο στο μαγνήτη και παραμένει σε αυτόν για 2 min ή μέχρι το διάλυμα να γίνει καθαρό.
- Προσεκτικά αφαιρείται το υπερκείμενο.
- Προστίθενται 150 µl 70% αιθανόλης σε κάθε φρεάτιο του πιάτου και το πιάτο μετακινείται στο μαγνήτη ώστε να πλυθούν τα σφαιρίδια. Μετά από 2 min αφαιρείται το υπερκείμενο.
- Προστίθενται ξανά 150 µl 70% αιθανόλης και μετακινείται το πιάτο στις 2 θέσεις του μαγνήτη και παραμένει σε αυτή τη θέση για 2 min. Στη συνέχεια, αφαιρείται το υπερκείμενο.
- Πρέπει όλα τα σταγονίδια αιθανόλης να απομακρυνθούν και να στεγνώσουν τα σφαιρίδια σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.

#### Ποσοτικοποίηση με χρήση Qubit 2.0 Fluorometer

Αρχικά οι Ion AmpliSeq™ βιβλιοθήκες πρέπει να ενισχυθούν πριν την ποσοτικοποίηση ώστε να εμπλουτιστεί το ενισχυμένο υλικό και να αποκτηθεί επαρκές υλικό για την ακριβή ποσοτικοποίηση. Η ενίσχυση των βιβλιοθηκών γίνεται με το Platinum® PCR SuperMix High Fidelity και στη συνέχεια γίνονται οι καθαρισμοί. Το μηχάνημα που χρησιμοποιούμε για την ποσοτικοποίηση της βιβλιοθήκης είναι το Fluorometer Qubit® 2.0. Μετά τον ποσοτικό προσδιορισμό, γίνεται προσδιορισμός του συντελεστή αραίωσης που καταλήγει σε μία συγκέντρωση περίπου 100 pM (ή περίπου 15-22 ng/ml για την Fluorometer Qubit® 2.0).

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι:

- Το πιάτο αφαιρείται από το μαγνήτη και προστίθενται 50 µl Platinum® PCR SuperMix HiFi και 2µl του Library Amplification Primer Mix σε κάθε ίζημα από σφαιρίδια.

- Στο πιάτο τοποθετείται μεμβράνη, γίνεται περιδίνηση και κατακρήμνιση ή πιπετάρισμα τουλάχιστον 5 φορές.
- Το πιάτο εισάγεται στο μαγνήτη και παραμένει εκεί για τουλάχιστον 2 min.
- 50 µl από το υπερκείμενο μεταφέρονται σε διπλανό φρεάτιο χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα.
- Εισέρχεται το πιάτο στο θερμοκυκλοποιητή και ακολουθείται το παρακάτω πρόγραμμα:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Διατήρηση	98 °C	2 min
5 κύκλοι	98 °C	15 sec
	64 °C	1 min
Διατήρηση	10 °C	Διατήρηση

Έπειτα λαμβάνουν χώρα 2 γύροι καθαρισμών με το αντιδραστήριο Agencourt AMPure XP:

Στο πρώτο γύρο ο λόγος σφαιριδίων προς όγκος δείγματος είναι 0,5: DNA υψηλού μοριακού βάρους είναι δεσμευμένο σε σφαιρίδια, ενώ τα amplicons και οι εκκινητές παραμένουν στο διάλυμα. Σε αυτή τη περίπτωση πρέπει να διατηρηθεί το υπερκείμενο.

- Προστίθενται 25 µl (0,5 X όγκου του δείγματος) του αντιδραστηρίου Agencourt AMPure XP σε κάθε φρεάτιο. Γίνεται πιπετάρισμα τουλάχιστον 5 φορές.
- Τα διαλύματα επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.
- Το πιάτο εισέρχεται στο μαγνήτη για 5 min ή και περισσότερο μέχρι να καθαρίσει τελείως.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται προσεκτικά σε άλλο φρεάτιο.

Στο δεύτερο γύρο καθαρισμών ο λόγος σφαιριδίων προς τον όγκο του αρχικού δείγματος είναι 1,2: Τα amplicons είναι δεσμευμένα σε σφαιρίδια, και οι εκκινητές παραμένουν στο διάλυμα. Διατηρείται το ίζημα με τα σφαιρίδια και γίνεται έκπλυση των amplicons από τα σφαιρίδια.

- Στο υπερκείμενο από το προηγούμενο βήμα γίνεται προσθήκη 60 µl (1.2X του αρχικού όγκου του δείγματος) του αντιδραστηρίου Agencourt AMPure XP και πιπετάρισμα 5 φορές.
- Τα διαλύματα παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.
- Το πιάτο εισάγεται στο μαγνήτη για 3 min ή και περισσότερο μέχρι να καθαριστεί τελείως.
- Προσεκτικά αφαιρείται και απορρίπτεται το υπερκείμενο χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα καθώς σε αυτό βρίσκονται τα amplicons.
- 150 µl 70%αιθανόλης προστίθενται στο πιάτο και μεταφέρεται το πιάτο στις δύο θέσεις του μαγνήτη ώστε να πλυθούν τα σφαιρίδια και παραμένει σε αυτή τη θέση για 2 min.
- Αφαιρείται και απορρίπτεται το υπερκείμενο χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα
- Προστίθενται ξανά 150 µl 70%αιθανόλης και το πιάτο μεταφέρεται στις 2 θέσεις του μαγνήτη ώστε να πλυθούν τα σφαιρίδια και παραμένει σε αυτή τη θέση για 2 min.
- Αφαιρείται και απορρίπτεται το υπερκείμενο χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα
- Όλα τα σταγονίδια αιθανόλης πρέπει να απομακρυνθούν και τα σφαιρίδια πρέπει να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.
- Αφαιρείται το πιάτο από το μαγνήτη και προστίθενται 50µl Low TE στο ίζημα που θα διασπείρουν τα σφαιρίδια. Γίνεται πιπετάρισμα τουλάχιστον 5 φορές.
- Το πιάτο τοποθετείται στο μαγνήτη για 2 min.

Τελικό βήμα της ποσοτικοποίησης είναι χρήση του Qubit 2.0 Fluorometer. Αρχικά γίνεται προγραμματισμός του Qubit® 2.0 Fluorometer με τη μέτρηση 2 Qubit® standards και στη συνέχεια αναλύονται 10 µl της ενισχυμένης βιβλιοθήκης.

Αφού ονομαστούν τα 0.5-mL PCR σωληνάρια, γίνεται αραιώση 1:200 του αντιδραστηρίου Qubit® dsDNA HS με τη χρήση του Qubit® dsDNA HS Buffer.

- Προστίθεται σε κάθε 0.5-mL PCR σωληνάριο 190 µl του αραιωμένου αντιδραστηρίου Qubit® dsDNA HS και 10 µl από τα Qubit® standards (2) σε 2 από τα 0.5-mL PCR σωληνάρια.
- Από τις ενισχυμένες βιβλιοθήκες προστίθενται 10 µl σε 0.5-mL PCR σωληνάρια στα οποία είχαν προστεθεί 190 µl του αραιωμένου αντιδραστηρίου Qubit® dsDNA HS και εκτελείται πιπετάρισμα.
- Τα διαλύματα επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 min.
- Στην οθόνη του Qubit® 2.0 Fluorometer επιλέγεται «DNA»→«dsDNA High Sensitivity» ώστε να εμφανιστεί η οθόνη με τα standards.
- Αφού καθοριστούν τα standards και επομένως γίνει ο προγραμματισμός του μηχανήματος εισάγονται τα δείγματα και επιλέγεται «Read». Ο αριθμός που εμφανίζεται στην οθόνη είναι η συγκέντρωση της αραιωμένης βιβλιοθήκης. Για να γίνει υπολογισμός της συγκέντρωσης του αρχικού δείγματος επιλέγεται η εντολή «Calculate Stock Conc» και εισάγεται η ποσότητα του αρχικού δείγματος. Εναλλακτικά, μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση DNA του μη αραιωμένου δείγματος με την εξίσωση:

Συγκέντρωση δείγματος = QF value × 200/x

όπου QF value = η τιμή που δίνεται από το Qubit® 2.0 Fluorometer

x = η ποσότητα σε µl του δείγματος που αραιώθηκε

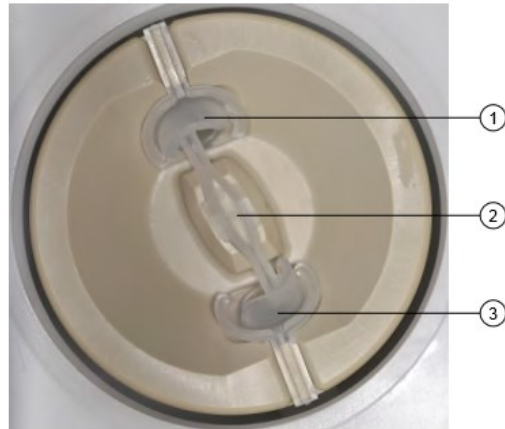
- Μετά το τέλος των μετρήσεων υπολογίζεται ο παράγοντας αραιώσης ώστε η συγκέντρωση της τελικής βιβλιοθήκης να είναι περίπου 100 pM. Για να υπολογιστεί ο παράγοντας αραιώσης διαιρείται η συγκέντρωση της βιβλιοθήκης με το 22 ng/ml (που είναι για amplicons μέχρι 275 bp).
- Αραιώνονται οι βιβλιοθήκες στα 100 pM και γίνεται συνδυασμός τους. Για να γίνει συνδυασμός των βιβλιοθηκών πρέπει να προστεθούν ίσες ποσότητες από τις διαφορετικές βιβλιοθήκες.

### **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3**

#### **PCR ΣΕ ΓΑΛΑΚΤΩΜΑ**

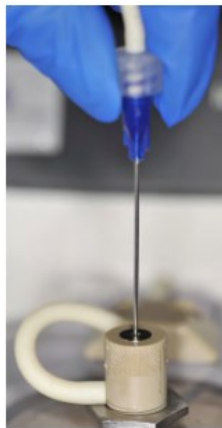
##### Προετοιμασία του Ion OneTouch™ 2

- Τοποθέτηση των σωληναρίων Ion OneTouch™ Recovery και του Ion OneTouch™ Recovery Router (εικ.41)
  - Στην οθόνη του Ion OneTouch™ 2 Instrument επιλέγεται η εντολή «Open Lid για να ανοίξει το καπάκι .
  - Τοποθετούνται 150 µl του διαλύματος Ion OneTouch™ Breaking σε κάθε ένα από τα φιαλίδια ανάκτησης (recovery tubes).
  - Τα φιαλίδια ανάκτησης που περιέχουν το διάλυμα Ion OneTouch™ Breaking τοποθετούνται σε κάθε σχισμή που υπάρχει στη φυγόκεντρο.
  - Προστίθεται το Ion OneTouch™ Recovery Router στη σχισμή που υπάρχει στο κέντρο της φυγόκεντρος.



**Εικόνα 41:** Τρόπος τοποθέτησης των 1) Ion OneTouch™ Recovery Tube, 2) Ion OneTouch™ Recovery Router και 3) Ion OneTouch™ Recovery Tube.

- Τοποθέτηση του Ion OneTouch™ 2 Amplification Plate.
- Τοποθέτηση της βελόνας (disposable injector) (εικ.42).



**Εικόνα 42:** Ο τρόπος τοποθέτησης της βελόνας (disposable injector).

- Τοποθέτηση του λαδιού Ion OneTouch™ στο σωληνάριο του αντιδραστηρίου Ion OneTouch™ στην αριστερή υποδοχή του μηχανήματος.
- Τοποθέτηση του διαλύματος Ion OneTouch™ Recovery στην δεξιά υποδοχή του μηχανήματος.
- Το δοχείο απορριμμάτων (waste container) αδειάζετε.

#### Προετοιμασία του ενισχυμένου διαλύματος

- Αραίωση της βιβλιοθήκης με τη προσθήκη 2μl αυτής και 23μl Nuclease-free Water.
- Προετοιμασία των Ion PGM™ Hi-Q™ ISPs με περιδίνηση για 1 min.
- Στο φιαλίδιο των 2 ml που περιέχονται 800 μl Ion PGM™ Hi-Q™ Reagent Mix και προστίθενται τα παρακάτω με την ακόλουθη σειρά και κάθε φορά που προστίθεται ένα διάλυμα γίνεται πιπετάρισμα.

Διάλυμα	Ποσότητα
Νερό χωρίς νουκλεάση	25 $\mu$ L
Ion PGM™ Hi-Q™ μείγμα ενζύμων	50 $\mu$ L
Αραιωμένη βιβλιοθήκη	25 $\mu$ L
Ion PGM™ Hi-Q™ ISPs	100 $\mu$ L
Σύνολο	200 $\mu$ l

- Εκτελείται περιδίνηση για 5 sec.
- Στο Ion OneTouch™ Reaction Filter εισέρχεται το διάλυμα που παρασκευάστηκε. Στη συνέχεια, γίνεται περιδίνηση και πιετάρισμα.
- Μέσα στο Ion OneTouch™ Reaction Filter προστίθενται 1,7 ml λάδι αντίδρασης Ion OneTouch™ (εικ.43).
- Τοποθετείται το γεμάτο πλέον Ion OneTouch™ Reaction Filter στο μηχάνημα .



**Εικόνα 43:** Το Ion OneTouch™ Reaction Filter.

#### Το μηχάνημα τίθεται σε λειτουργία

- Στην οθόνη επιλέγεται η εντολή «Run»→ Επιλέγεται σα πρωτόκολλο το «PGM:Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Kit-400»→«Next»→Επιλέγεται ως «Protocol Proton» το «Assisted» και για κάθε διαδικασία που ολοκληρώνεται από τις διαδικασίες που περιγράφει το μηχάνημα επιλέγεται η εντολή «Next».

#### Ανάκτηση των Ion PGM™ Hi-Q™ ISPs

- Στην οθόνη του μηχανήματος επιλέγεται «Options→ Final Spin» ώστε να φυγοκεντρηθούν τα δείγματα για 10 min.
- Με το τέλος της φυγοκέντρησης, η πόρτα του μηχανήματος ανοίγει με την εντολή « Open Lid».
- Αφαιρείται και απορρίπτεται το Ion OneTouch™ Recovery Router.
- Αφαιρούνται τα 2 σωληνάρια ανάκτησης του Ion OneTouch™ από το μηχάνημα Ion OneTouch™ 2.
- Από τα 2 σωληνάρια ανάκτησης του Ion OneTouch™ αφαιρείται όλο το υγρό εκτός από 150  $\mu$ l και εκτελείται πιετάρισμα μέχρι να διασπείρουν όλα τα σφαιρίδια στο διάλυμα .



- Σε ένα 1.5-mL σωληνάριο προστίθενται 500  $\mu$ L από το διάλυμα Ion OneTouch™ Wash για κάθε σωληνάριο ανάκτησης και προστίθενται τα ISPs.
- Εκτελείται φυγοκέντρηση των ISPs για 2.5 min στις  $15,500 \times g$ .
- Αφαιρείται όλο το υγρό εκτός από 100  $\mu$ L, γίνεται πιπετάρισμα 10 φορές και μεταφέρεται στο φρεάτιο 1 από το 8-well strip.

Μετά το τέλος των διαδικασιών πρέπει να γίνει καθαρισμός του μηχανήματος. Για να γίνει ο καθαρισμός ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

- Αρχικά ελέγχεται η στάθμη του λαδιού Ion OneTouch™ στα σωληνάρια με τα αντιδραστήρια. Ελέγχεται δηλαδή αν στο αριστερό σωληνάριο η στάθμη είναι  $\geq 20$  mL, εάν δεν είναι προσθέτεται λάδι μέχρι να φτάσει η στάθμη σχεδόν στη μέση.
- Το Ion OneTouch™ 2 Amplification Plate διατηρείται στη θέση του.
- Αφαιρείται το Ion OneTouch™ Reaction Filter από την ειδική υποδοχή στην επιφάνεια του μηχανήματος και το αντικαθίσταται με το Ion OneTouch™ Cleaning Adapter.
- Αφαιρείται η βελόνα από το Ion OneTouch™ DL Injector Hub.
- Αφού τραβηχτεί το πλαστικό σωληνάριο που συνδέεται με τη βελόνα από την ειδική υποδοχή, εισάγεται η βελόνα μέσα σε ένα κωνικό σωληνάριο των 50 ml που θα χρησιμοποιηθεί για τα απόβλητα.
- Στην οθόνη του μηχανήματος επιλέγεται η εντολή «Clean» και μετά το τέλος των διαδικασιών που αναγράφονται στην οθόνη επιλέγεται η εντολή «Next». Μόλις ολοκληρωθεί η τελευταία διαδικασία τότε εμφανίζεται στην οθόνη μία μπάρα προόδου και ξεκινάει ο καθαρισμός.
- Όταν τελειώσει ο καθαρισμός στην οθόνη εμφανίζεται το «Time Remaining 00:00:00, Cleaning Run Complete».
- Διατηρείται στη θέση τους το plate, η βελόνα, τα κωνικά σωληνάρια, και το δοχείο απορριμμάτων μέχρι την επόμενη χρήση του μηχανήματος όπου θα αντικατασταθούν.

#### ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4 ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ (ENRICHMENT)

Προετοιμασία των αντιδραστηρίων που θα τοποθετηθούν στο 8 well strip(εικ.44).



**Εικόνα 44:** Το 8- well strip και τρόπος τοποθέτησης του στο μηχανήμα.

- Προετοιμασία του Melt Off Solution προσθέτοντας τα διαλύματα με την ακόλουθη σειρά

Σειρά	Αντιδραστήρια	Ποσότητα
1	Tween® Διάλυμα	280 µl
2	1M NaOH	40 µl
	Σύνολο	320 µl

- Πλένονται και επαναιωρούνται τα σφαιρίδια στρεπταμιδίνης Dynabeads® MyOne™ με περιδίνηση για 30 sec και φυγοκέντρωση για 2 sec, γίνεται πιπετάρισμα και μεταφορά 13 µl σε 1.5-mL σωληνάριο. Προσθήκη στο μαγνήτη για 2 min και αφαίρεση υπερκειμένου χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα. Προσθήκη 130 µl διαλύματος MyOne™ Beads Wash. Αφαίρεση διαλύματος από το μαγνήτη, περιδίνηση και φυγοκέντρωση για 2 sec.
- Η συμπλήρωση του 8 - well strip γίνεται με το παρακάτω τρόπο:

Φρεάτια	Αντιδραστήρια
1	Όλο το δείγμα ISP 100 µL
2	130 µL από σφαιρίδια στρεπταμιδίνης Dynabeads® MyOne™ επαναιωρημένα σε MyOne™ Beads Wash Solution
3	300 µl από το διάλυμα Ion OneTouch™ Wash (W)
4	300 µl από το διάλυμα Ion OneTouch™ Wash (W)
5	300 µl από το διάλυμα Ion OneTouch™ Wash (W)
6	Άδειο
7	300 µl από το διάλυμα Melt- Off
8	Άδειο

- Το 8-well strip τοποθετείται στο Ion OneTouch™ ES (με το τετράγωνο σχήμα να βρίσκεται προς τα αριστερά). Στη συνέχεια, τοποθετείται καινούριο tip στην υποδοχή (Tip Arm).
- Σε ένα 0.2-mL PCR σωληνάριο εισάγονται 10 µl διαλύματος Neutralization και τοποθετείται το ανοιχτό 0.2-mL PCR σωληνάριο κάτω από την υποδοχή του tip (Tip Arm).
- Πριν ξεκινήσει η διαδικασία γίνεται πιπετάρισμα στο φρεάτιο 2 από το 8 well strip.
- Το μηχάνημα όταν ανοίξει εμφανίζει στην οθόνη την ένδειξη «rdy» → Επιλέγεται το κουμπί «Start/ Stop».
- Η διαδικασία διαρκεί περίπου 35 min και με το τέλος της υπάρχει ειδοποίηση που χτυπάει κάθε 60 sec μέχρι να ξαναπατηθεί το κουμπί « Start/ Stop»

- Τα εμπλουτισμένα ISPs βρίσκονται στο 0.2-mL PCR σωληνάριο. Γίνεται αφαίρεση του tip και το 8 well strip και απόρριψη του.  
Τα εμπλουτισμένα ISPs μπορούν να διατηρηθούν στους 2° C με 8° C για 3 ημέρες.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 5

### ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ION PGM

#### Προγραμματισμός του μηχανήματος

Για να γίνει ο προγραμματισμός του πειράματος στο μηχάνημα γίνεται σύνδεση στο διακομιστή του. Στην καρτέλα «plan»→«AmpliSeq DNA» επιλέγεται το όνομα του panel σύμφωνα με το οποίο θα τρέξει το πείραμα. Στην σελίδα που εμφανίζεται, δηλαδή στη καρτέλα «Created Plan» (εικ.45) συμπληρώνεται το όνομα του πειράματος, η βάση δεδομένων από την οποία θα δοθούν πληροφορίες για την αλληλουχία, η περιοχή που θα αλληλουχηθεί με το πείραμα αυτό, τα δείγματα που θα τρέξουν σε αυτό το πείραμα και ορισμένες πληροφορίες για αυτά. Στην καρτέλα «IonReporter» επιλέγεται ο λογαριασμός και η ροή εργασιών που θα ακολουθηθεί και στη καρτέλα «Applications» επιλέγεται που θα εφαρμοστεί το πείραμα και τα χαρακτηριστικά της αλληλουχίας στόχου. Στη καρτέλα «Kits» επιλέγονται τα kits που έχουν χρησιμοποιηθεί σε όλη τη διαδικασία του πειράματος, δηλαδή τη δημιουργία της βιβλιοθήκης, τη PCR σε γαλάκτωμα, τον εμπλουτισμό και την αλληλούχηση. Επίσης στην ίδια καρτέλα ζητείται ο τύπος του chip που θα χρησιμοποιηθεί και το kit των κωδικών ιχνηλασιμότητας που χρησιμοποιήθηκαν. Στη καρτέλα «plugins» προσθέτονται διαφορετικά προγράμματα που επεξεργάζονται την πληροφορία που υπάρχει για κάθε δείγμα. Στη καρτέλα «Projects» επιλέγεται ο φάκελος στον οποίο θα αποθηκευτούν τα δεδομένα από το συγκεκριμένο πείραμα. Στην τελευταία καρτέλα «Plan» προστίθενται τα δείγματα και ο κωδικός ιχνηλασιμότητας που τα συνοδεύει.

**Εικόνα 45:** Η καρτέλα «Created Plan», στην οποία συμπληρώνεται το όνομα του πειράματος, η βάση δεδομένων από την οποία θα δοθούν πληροφορίες για την αλληλουχία, η περιοχή που θα αλληλουχηθεί με το πείραμα αυτό, τα δείγματα που θα τρέξουν ταυτόχρονα σε αυτό το πείραμα και κάποιες πληροφορίες για αυτά.

### Καθαρισμός με χλωρίνη

- Κάθε φιάλη καθαρισμού (δύο φιάλες των 250 ml και μία 2-L φιάλη) αδειάζετε από τυχόν υπολείμματα και ξεπλύνετε δύο φορές με 100 ml νερό 18 MΩ.
- Μία γυάλινη φιάλη γεμίζεται με 1 λίτρο νερό 18 MΩ και προστίθεται ένας δισκίο καθαρισμού Ion PGM™.
- Όταν το δισκίο διαλυθεί, προστίθεται 1 ml από 1 M NaOH και διηθείται στο διάλυμα χρησιμοποιώντας φίλτρο
- Επιλέγεται η εντολή «Clean»→«Chlorite cleaning» στην οθόνη αφής.
- Τοποθετείται ένα χρησιμοποιημένο chip μέσα στον ειδικό θάλαμο. Αφαιρούνται όλες οι φιάλες που συνδέονται με το μηχάνημα και αφήνονται τα ακροφύσια.
- Προστίθενται 250 ml του διηθημένου διαλύματος χλωριωδών σε μία άδεια φιάλη των 250 ml.
- Αφού καθαριστεί το ακροφύσιο στην W1 θέση τότε εισάγεται η φιάλη των 250 ml που περιέχει το διηθημένο διάλυμα χλωριωδών.
- Τοποθετείται η άδεια 2L φιάλη στη θέση W2 και η κενή φιάλη των 250 ml στη θέση W3 και εισάγονται τα ακροφύσια στις φιάλες.
- Τοποθετείται ένας δίσκος περισυλλογής κάτω από τα ακροφυσιακή θέση των dNTPs
- Όταν ζητηθεί, αφαιρείται η φιάλη που περιέχει το διάλυμα χλωρίτη από το W1 θέση.
- Το ακροφύσιο στη θέση W1 καθαρίζεται και εισάγουμε σε αυτή τη θέση μία καθαρή φιάλη των 250 ml με 250 ml 18 MΩ νερού.
- Όταν ολοκληρωθεί ο καθαρισμός, αφαιρούνται οι φιάλες χωρίς να αφαιρεθούν τα ακροφύσια από την W1, W2 και W3 θέσεις. Αφήνονται στη θέση τους τα ακροφύσια των αντιδραστηρίων και ο δίσκος περισυλλογής.

### Καθαρισμός με νερό

- Κάθε φιάλη αδειάζετε από τα εναπομείναντα διαλύματα (δύο φιάλες των 250 ml και μία 2-L φιάλη) και ξεπλένεται δύο φορές με 100 ml νερό 18 MΩ.
- Επιλέγεται η εντολή «Clean»→«18-MOhm water cleaning»
- Χρησιμοποιώντας γυμνά χέρια, εισάγεται το chip στην ειδική υποδοχή .
- Απομακρύνονται όλες οι φιάλες καθαρισμού και αντιδραστηρίων. Διατηρώντας τα ακροφύσια στη θέση τους επιλέγεται η εντολή «Next».
- Προσθέτονται 250 ml 18 MΩ νερό σε φιάλη καθαρισμού 250 ml.
- Αφού καθαριστεί το ακροφύσιο στη θέση W1, συνδέεται η φιάλη των 250 ml που περιέχει 18 MΩ ύδατος σε αυτή τη θέση και επιλέγεται η εντολή «Next».
- Τοποθετούνται οι άδειες 2-L φιάλη καθαρισμού στη θέση W2 και 250-mL φιάλη στη θέση W3 και τα ακροφύσια στις φιάλες. Το δοχείο περισυλλογής διατηρείται στη θέση του.
- Όταν ολοκληρωθεί ο καθαρισμός, αφαιρούνται οι φιάλες και τα ακροφύσια από την W1, W2 και W3 θέσεις. Τα ακροφύσια στη θέση που συνδέονται τα δοχεία με τα dNTPs διατηρούνται καθώς και ο δίσκος περισυλλογής.

### Προετοιμασία του Ion PGM™ System

- Προετοιμασία του Wash 2 διαλύματος:
  - Ξεκινώντας με την προετοιμασία του μηχανήματος, ξεπλένεται η Wash 2 Φιάλη (2 L) τρεις φορές με 200 ml νερό 18 MΩ.

- Ετοιμάζονται 500 µL 100 mM NaOH με αραιώση 50 µL του 1 M NaOH σε 450 µL του ύδατος.
- Η φιάλη Wash 2 γεμίζει μέχρι τη γραμμή με 18 MΩ νερό. Στη συνέχεια, προστίθεται ολόκληρο το διάλυμα Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing W2 στη Wash 2 φιάλη και 70 µL από 100 mM NaOH στη Wash 2 φιάλη.
- Προετοιμασία των Wash 1 και Wash 3 διαλυμάτων:
  - Ξεπλένονται οι φιάλες Wash 1 και Wash 3 τρεις φορές με 50 ml 18 MΩ νερού.
  - Προετοιμασία του διαλύματος στη φιάλη Wash 1: Προστίθεται 350 µL από 100 mM NaOH.
  - Προετοιμασία του διαλύματος στη φιάλη Wash 2: Προστίθεται το διάλυμα Ion PGM™ Sequencing W3 στη γραμμή των 50-mL στη φιάλη Wash 3.
- Προετοιμασία του μηχανήματος:
  - Στο κύριο μενού στην οθόνη επιλέγεται το «Initialize»→«Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Kit»→«Next». Σε αυτή τη φάση το σύστημα θα ελέγξει την πίεση του αερίου. Εάν η πίεση είναι επαρκής τότε επιλέγεται το «Next». Αν η πίεση είναι χαμηλή τότε επιλέγεται το «Yes» για να γίνει επανέλεγχος.
  - Αντικαθιστάται το ακροφύσιο στη θέση W2 και τοποθετείται η φιάλη του Wash 2 στη θέση W2. Με τον ίδιο τρόπο εγκαθίστανται και οι φιάλες Wash 1 και 3.
  - Το μηχάνημα αρχίζει τη ρύθμιση του pH του W2 διαλύματος που θα διαρκέσει 30 λεπτά.
- Προετοιμασία των 50 ml σωληναρίων για αντιδραστήρια με τα dNTPs:
  - Χρησιμοποιώντας τις ετικέτες που παρέχονται με το kit τοποθετούνται στα σωληνάρια ώστε να επισημαίνονται τα 4 διαφορετικά σωληνάρια με τις εξής ετικέτες dGTP, dCTP, dATP και dTTP.
  - Αφού γίνει επιβεβαίωση ότι δεν υπάρχουν ορατοί κρύσταλλοι σε κάθε αποψυγμένο διάλυμα dNTP, γίνεται περιδίνηση σε κάθε σωληνάριο ώστε να αναμειχθούν τα διαλύματα και στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρωση. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας πρέπει τα σωληνάρια με τα dNTPs να βρίσκονται στο πάγο.
  - Στη συνέχεια, μεταφέρονται 20 µl από κάθε σωληνάριο με τα dNTPs σε ξεχωριστό σωληνάριο αντιδραστηρίων.
  - Μετά το τέλος του προετοιμασίας, ακολουθούνται οι οδηγίες στην οθόνη που αναφέρουν να αφαιρεθούν τα ακροφύσια από τη θέση που τοποθετούνται τα σωληνάρια με τα dNTPs και ταυτόχρονα αφαιρείται το δοχείο περισυλλογής.
  - Αλλάζοντας γάντια, προστίθενται τα καινούρια ακροφύσια στη θέση που τοποθετούνται τα σωληνάρια με τα dNTP. Προστίθενται τα σωληνάρια με τα dNTPs.
  - Ακολουθούνται οι οδηγίες στην οθόνη αφής μέχρι να ολοκληρωθεί η προετοιμασία του μηχανήματος. Το μηχάνημα θα γεμίζει τα σωληνάρια με τα dNTPs με 40 mL από το W2 Solution.
  - Στο τέλος της προετοιμασίας, το Ion PGM™ System θα μετρήσει το pH των αντιδραστηρίων. Εάν το pH των αντιδραστηρίων είναι μέσα στο αποδεκτό εύρος τιμών τότε στην οθόνη εμφανίζεται μία πράσινη Passed screen.

#### Φόρτωση του chip

- Γίνεται περιδίνηση στα Control Ion Sphere™ Particles (Control ISPs).

- Προστίθενται 5  $\mu\text{L}$  των Control ISPs απευθείας στο σύνολο του όγκου των εμπλουτισμένων ISPs σε 0.2mL PCR σωληνάριο.
- Τοποθετείται το σωληνάριο στη μικροφυγόκεντρο και γίνεται φυγοκέντρωση για 2 min στα 15,500  $\times$  g.
- Αφαιρείται προσεκτικά το υπερκείμενο, αποφεύγοντας τη πλευρά που βρίσκονται τα σφαιρίδια (ίζημα) και απορρίπτεται. Στο σωληνάριο παραμένουν 15  $\mu\text{L}$ .
- Οι εκκινητές της αλληλούχησης (Sequencing Primer) δεν πρέπει να έχουν εμφανείς κρυστάλλους, δηλαδή πρέπει να έχουν αποψυχθεί πλήρως. Γίνεται περιδίνηση τους για 5 sec και κατακρήμνιση τους. Στη συνέχεια, προστίθενται 12  $\mu\text{L}$  των εκκινητών της αλληλούχησης στα ISPs και επιβεβαιώνεται ότι ο συνολικός όγκος είναι 27  $\mu\text{L}$  (προστίθεται Annealing Buffer εάν είναι απαραίτητο).
- Πιπετάρεται το μείγμα μέχρι να διαλυθεί το ίζημα.
- Εισάγεται το σωληνάριο στο θερμοκυκλοποιητή και ακολουθείται το παρακάτω πρόγραμμα: 95°C για 2 min και στους 37 °C για 2 min χρησιμοποιώντας την επιλογή θερμαινόμενο καπάκι.
- Chip check, δηλαδή έλεγχος του chip πριν τη χρήση.
  - Από το κύριο μενού της οθόνης αφής του Ion PGM™ Sequencer, επιλέγεται η εντολή «Run
  - Όταν ζητηθεί εισάγεται το chip.
  - Επιλέγεται το μέσο παρασκευής των template-positive ISPs και αντικαθίσταται το chip.
  - Στην οθόνη αφής επιλέγεται η εντολή «Change» ώστε να εισαχθεί το barcode του chip. → «Chip Check» → «Next».
- Για να λάβει χώρα η δέσμευση της Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Polymerase με τα ISPs γίνεται προσθήκη 3  $\mu\text{L}$  πολυμεράσης στα ISPs που έχουν βγει από το θερμοκυκλοποιητή.
- Φόρτωση του chip
  - Αφαιρείται το chip από το Ion PGM™ Sequencer και τοποθετείται στη θέση του το χρησιμοποιημένο chip. Το chip βρίσκεται σε κλίση 45 μοιρών με τη θύρα φόρτωσης προς τα κάτω και με μία πιπέτα αφαιρείται όσο περισσότερο υγρό γίνεται.
  - Τοποθετείται το chip ανάποδα στη θέση υποδοχής της μικροφυγόκεντρος και γίνεται φυγοκέντρωση για 5 sec. Αφού καθαριστεί η μικροφυγόκεντρος τοποθετείται το chip από την άλλη μεριά και ξαναφυγοκεντρείται .
  - Για να εισαχθεί το διάλυμα στο chip γίνεται επιλογή από τους ακόλουθους όγκους ανάλογα με το είδος του chip. Αν το chip είναι τύπου Ion 316™ ή Ion 318™ Chip τότε γίνεται μεταφορά όλου του όγκου των ISPs δηλαδή ~30  $\mu\text{L}$ , ενώ αν το chip είναι Ion 314™ Chip τότε μεταφέρονται 10  $\mu\text{L}$ .
  - Εισάγεται σταθερά το tip στην υποδοχή . Με αργό ρυθμό (1  $\mu\text{L}/\text{second}$ ) εισάγεται η ποσότητα του διαλύματος στο chip. Μία μικρή ποσότητα (0,5  $\mu\text{L}$  ) παραμένει στην άκρη του tip για να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες. Αφαιρείται και απορρίπτεται κάθε υγρό που εκτοπίζεται από την άλλη θύρα του chip.
  - Μεταφέρεται το chip στη μικροφυγόκεντρο και φυγοκεντρείται δύο φορές από 30 sec μία με το chip tab προς το εσωτερικό και μία προς το εξωτερικό.
  - Ρυθμίζεται η πιπέτα σε όγκο ανάλογο προς το είδος του chip, δηλαδή εάν το chip είναι Ion 316™ ή Ion 318™ Chip η πιπέτα ρυθμίζεται στα 25  $\mu\text{L}$ , ενώ εάν το chip είναι Ion 314™ Chip στα 5  $\mu\text{L}$ . Κρατώντας το chip σε κλίση 45 μοιρών εισροφούμε αργά υγρό και το απορρίπτουμε .

- Εισάγουμε το chip στη μικροφυγόκεντρο ανάποδα και φυγοκεντρείται για 5sec. Αφαιρείται και απορρίπτεται το εναπομείναν υγρό.
- Φορτώνεται το chip στο μηχάνημα.
- Η επιλογή του σχεδιασμένου προγράμματος στο μηχάνημα γίνεται με την εντολή «Browse» δίπλα στο πεδίο «Planned Run» και επιλέγεται το όνομα του σχεδιασμού. Όταν ζητηθεί από το μηχάνημα γίνεται εισαγωγή του chip στην ειδική θέση και ξεκινάει η αλληλούχηση.

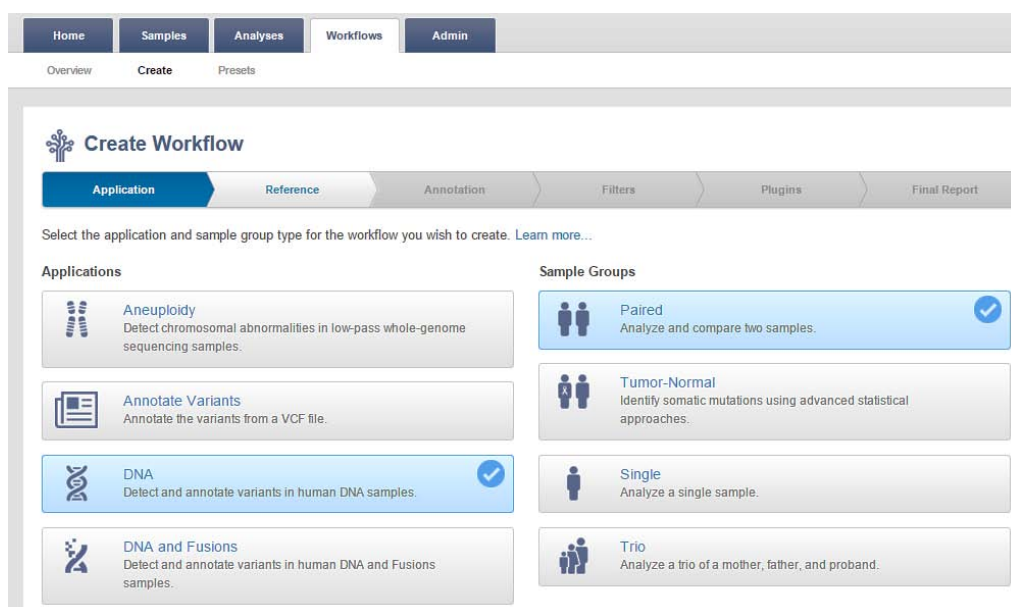
## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 6

### ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΡΟΗΣ ΕΡΓΑΣΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΥΡΕΣΗ ΤΩΝ CNVs

Για να γίνει η σύγκριση δύο δειγμάτων (του δείγματος ελέγχου και του προς επεξεργασία δείγματος) δημιουργήθηκε μία συγκεκριμένη ροή εργασιών. Για να δημιουργηθεί η ροή εργασιών επιλέγεται στην ιστοσελίδα της Ion Torrent η καρτέλα «Workflow»→«Create». Στην καρτέλα «Applications» επιλέγεται «DNA» ώστε να εντοπισθούν οι μεταλλάξεις στα προς διερεύνηση δείγματα και «Paired» ώστε να συγκριθούν δύο δείγματα (εικ.46). Στη καρτέλα «Reference» επιλέγεται η συγκεκριμένη περιοχή για την οποία γίνεται η μελέτη. Στη καρτέλα «Annotation» επιλέγεται η εντολή «All» και στη καρτέλα «Filters» επιλέγεται το φίλτρο σύμφωνα με το οποίο θα επεξεργαστεί το σύστημα τις πληροφορίες που θα προκύψουν από τη σύγκριση του δείγματος ελέγχου και του προς έρευνα δείγματος. Στη συγκεκριμένη περίπτωση το φίλτρο που επιλέγεται είναι «Confident Germline CNVs-CNVs Only» ώστε από τη σύγκριση να δοθούν μόνο τα CNVs. Τέλος, στην καρτέλα

«Confirm» δίνεται όνομα στη συγκεκριμένη ροή εργασιών.

Για να λάβει χώρα η σύγκριση του δείγματος ελέγχου με το προς ταυτοποίηση δείγμα επιλέγεται η καρτέλα «Analysis»→«Launch»→«Workflow» στην οποία επιλέγεται η ροή εργασιών που θα ακολουθηθεί. Στην συνέχεια, στην καρτέλα «Samples and Relationships» επιλέγεται ποιο δείγμα θα είναι το δείγμα ελέγχου και ποιο δείγμα θα είναι το προς ταυτοποίηση. Τέλος, στην καρτέλα «Confirm & Launch» δίνεται όνομα στη συγκεκριμένο διεργασία (εικ.47).



**Εικόνα 46:** Στη καρτέλα «Applications» επιλέγεται «DNA» ώστε να εντοπισθούν οι μεταλλάξεις στα προς διερεύνηση δείγματα και «Paired» ώστε να συγκριθούν δύο δείγματα.

Ion Reporter

Hi, CeMIA CeMIA
5.3 GB/100 GB
Help
Sign Out

Home

Samples

Analyses

Workflows

Admin

Overview

Launch

My Variants

CeMIA SA • Ion Reporter 5

Launch Analysis

Workflow

Samples & Relationships

Plugins

Confirm & Launch

Select the samples you wish to analyze and click the "Add Samples" button, then give your relationship a name. You can create multiple relationships and each one will be treated as a separate analysis. [Learn more...](#)

Samples

Search

	Sample	Gender	Sample Type	Role	Imported By	Imported On
<input type="checkbox"/>	H168_v1	Male	DNA	proband	CeMIA, CeMIA	Jun 24 2016 04:50 AM
<input type="checkbox"/>	3830_v1	Male	DNA	proband	CeMIA, CeMIA	Jun 24 2016 04:50 AM
<input type="checkbox"/>	3044_v1	Male	DNA	proband	CeMIA, CeMIA	Jun 24 2016 04:50 AM
<input type="checkbox"/>	3390_v1	Male	DNA	proband	CeMIA, CeMIA	Jun 24 2016 04:49 AM
<input type="checkbox"/>	4360_v1	Male	DNA	proband	CeMIA, CeMIA	Jun 24 2016 04:49 AM
<input type="checkbox"/>	4356_v1	Male	DNA	proband	CeMIA, CeMIA	Jun 24 2016 04:49 AM
<input type="checkbox"/>	3001N_v1	Male	DNA	proband	CeMIA, CeMIA	Jun 24 2016 04:49 AM
<input type="checkbox"/>	3642_v1	Male	DNA	proband	CeMIA, CeMIA	Jun 24 2016 04:49 AM

Add Samples

Relationship Name (Required)

Sample: Empty

Control: Empty

Add to Analysis

**Εικόνα 47:** Στην καρτέλα «Samples and Relationships» επιλέγεται ποιο δείγμα θα είναι το δείγμα ελέγχον και ποιο δείγμα θα είναι το προς ταυτοποίηση.



Η εύρεση των CNVs με τη σύγκριση του προς ταυτοποίηση δείγματος με δέκα δείγματα ελέγχου απαιτεί μία διαφορετική ροή εργασιών. Αρχικά πριν ξεκινήσει ο σχεδιασμός της συγκεκριμένης ροής εργασιών πρέπει να ρυθμιστούν κάποιες παράμετροι για να χρησιμοποιηθούν ως προκαθορισμένες ρυθμίσεις όταν θα λάβει χώρα ο σχεδιασμός αυτός. Οι διαδικασίες που ακολουθούνται για το προκαθορισμό των ρυθμίσεων είναι: στην καρτέλα «Workflows»→«Presets»→«Create a preset»→«Copy Number Baseline» (εικ.48). Οι επιλογές αυτές οδηγούν στη καρτέλα «Baseline Type», στην οποία επιλέγεται «Ampliseq» και η περιοχή στόχος στο δείγμα προς ταυτοποίηση. Στη συνέχεια, στη καρτέλα «Samples» επιλέγονται τα δείγματα που θα χρησιμοποιηθούν ως δείγματα ελέγχου, στη καρτέλα «Confirm» δίνεται όνομα στο σχεδιασμό αυτό και ολοκληρώνεται η διαδικασία αυτή. Για το σχεδιασμό της ροής εργασιών στην καρτέλα «Workflows»→«Create»→«Application» επιλέγεται το «DNA» ώστε να εντοπισθούν οι μεταλλάξεις στα προς διερεύνηση δείγματα και «Single» (εικ.49). Στην επόμενη καρτέλα, «Reference» επιλέγεται η συγκεκριμένη περιοχή για την οποία γίνεται η μελέτη και η οποία υπάρχει ως προεπιλογή. Στη καρτέλα «Copy Number» επιλέγεται ο σχεδιασμός που είχε πραγματοποιηθεί πριν την έναρξη της ροής εργασιών. Τέλος, στην καρτέλα «Confirm» δίνεται όνομα στο σχεδιασμό αυτό και ολοκληρώνεται η διαδικασία.

Για να γίνει η χρήση της συγκεκριμένης ροής εργασιών για την εύρεση των CNVs στο προς ταυτοποίηση δείγμα στην καρτέλα «Analysis»→«Launch»→«Workflow» επιλέγεται η ροή εργασιών που συγκρίνει τα δέκα δείγματα ελέγχου με το προς ταυτοποίηση δείγμα. Στην καρτέλα «Samples» επιλέγεται το προς ταυτοποίηση δείγμα ή δείγματα.

Ion Reporter

Hi, CeMIA CeMIA
5.3 GB/100 GB
Help
Sign Out

Home

Samples

Analyses

Workflows

Admin

Overview

Create

Presets

CeMIA SA • Ion Reporter 5.0

Workflow Presets

Annotation Sets

Version

Refresh

	ion torrent	Name	Version	Modified By	Modified On	Status
	ion torrent	All	5.0	Admin, IR	Sep 25 2015 03:15 AM	Locked
	ion torrent	Aneuploidy	5.0	Admin, IR	Sep 25 2015 03:15 AM	Locked
	ion torrent	All	4.6	Admin, IR	May 29 2015 04:33 AM	Locked
	ion torrent	Aneuploidy	4.6	Admin, IR	May 29 2015 04:33 AM	Locked

Import Preset

Create Preset

Annotation Set

Filter Chain

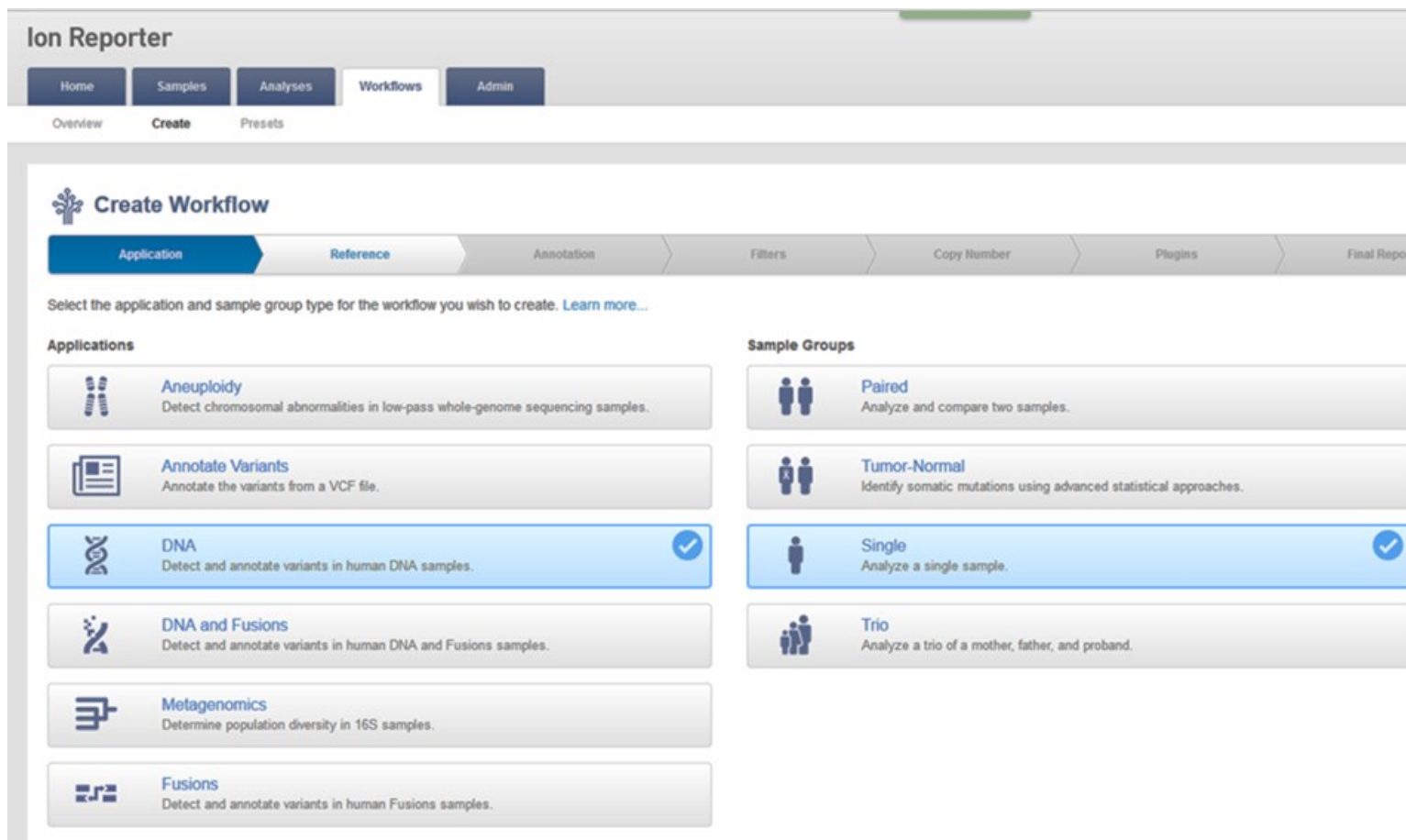
Copy Number Baseline

Final Report Template

Details

Annotation sets provide content that is used to annotate your variants. S  
information.  
Select a row to view further details and actions.

**Εικόνα 48:** Ρύθμιση παραμέτρων με σκοπό να χρησιμοποιηθούν ως προκαθορισμένες ρυθμίσεις όταν θα λάβει χώρα ο σχεδιασμός της ροής εργασιών.



**Εικόνα 49:** Στη καρτέλα «Applications» επιλέγεται «DNA» ώστε να εντοπισθούν οι μεταλλάξεις στα προς διερεύνηση δείγματα και «Single» για να συγκριθούν τα δείγματα με δέκα διαφορετικά δείγματα ελέγχου χωρίς CNVs.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### **Ανάπτυξη πρωτοκόλλου αλληλούχησης νέας γενεάς (Next- Gen-eration Sequencing, NGS) για την ανάλυση του γονιδίου *SERPING1*.**

Βάτσιου Σοφία

**ΣΚΟΠΟΣ** Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανάπτυξη του πρωτοκόλλου Ion Torrent NGS για το γονίδιο *SERPING1* με το μηχάνημα PGM. Παράλληλα έγινε αξιολόγηση της μεθόδου αυτής ως προς την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων, μικρών και μεγάλων προσθηκών και ελλείψεων που σχετίζονται με το κληρονομικό αγγειοίδημα και έχουν ανιχνευτεί και με άλλες μεθόδους (Sanger, MLPA, Long Range PCR).

**ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ** Για τη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 27 δείγματα ασθενών, τα οποία εξετάστηκαν με τη μέθοδο Ion Torrent NGS.

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Στα 24 από τα 27 δείγματα που εξετάστηκαν με NGS επιβεβαιώθηκε η μετάλλαξη που είχε ανιχνευθεί με τις μεθόδους Sanger, MLPA και Long Range PCR. Τα δείγματα που δεν επαληθεύτηκαν οι χαρακτηρισμένες μεταλλάξεις ήταν 3. Το πρώτο παρουσίασε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, το δεύτερο παρουσίασε διαφορά σε σχέση με τη μετάλλαξη που είχε ανιχνευτεί με τις μεθόδους Sanger – MLPA και στο τελευταίο παρουσιάστηκε ασυμφωνία της ταυτοποίησης με τα πραγματικά δεδομένα.

**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Η τεχνολογία του NGS είναι μία επαναστατική μέθοδος αλληλούχησης στην οποία λαμβάνουν χώρα μεγαλύτερος αριθμός αντιδράσεων ταυτόχρονα, μεγαλύτερων συνολικά τμημάτων DNA σε μικρότερο χρονικό διάστημα και με μεγαλύτερη ταχύτητα. Το πρωτόκολλο το οποίο αναπτύχθηκε χρήζει περαιτέρω βελτιώσεων για να μπορέσουν να καλυφθούν όλες οι γνωστές μεταλλάξεις του γονιδίου *SERPING1* που οδηγούν στο κληρονομικό αγγειοίδημα και είναι απαραίτητο να ελεγχθούν όλα τα διαθέσιμα δείγματα με τις χαρακτηρισμένες μεταλλάξεις στο συγκεκριμένο γονίδιο. Με την ενσωμάτωση των βελτιώσεων στις μικρές και μεγάλες βλάβες το πρωτόκολλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη ταχύτερη και σε μεγάλη κλίμακα τυποποίηση ασθενών με κληρονομικό αγγειοίδημα και των συγγενών τους.

## ABSTRACT

### Development of Next Generation Sequencing protocol for the analysis of *SERPING1* gene.

Vatsiou Sofia

**PURPOSE** The aim of this study was to develop the protocol Ion Torrent NGS for *SERPING1* gene with PGM machine. Furthermore, it was performed an evaluation of this method in detecting substitutions, small and large insertions and deletions associated with HAE and was detected by other methods (Sanger, MLPA, Long Range PCR).

**MATERIALS - METHODS** The study included 27 samples, which were examined by the method Ion Torrent NGS.

**RESULTS** In 24 of the 27 samples tested by NGS it was confirmed the mutation found with Sanger methods, MLPA and Long Range PCR. The samples in which the characterized mutations were not verified were 3. The first sample showed false negative results, the second showed a discrepancy with the mutation that had been detected by Sanger and MLPA and the last sample presented discrepancy in the identification with the actual data.

**CONCLUSIONS** NGS is a revolutionary method of sequencing in which higher number of reactions take place at the same time in less time and with higher speed. The protocol which has been developed needs further improvements in order to be able to cover all known mutations of *SERPING1* gene that lead to HAE and it is necessary to control all available samples with characterized mutations in this gene. With these improvements this protocol can be used for rapid and large-scale sequencing of patients with HAE and their relatives.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1 MOLDOVAN D, CSEQ K. Genetics of hereditary angioedema, *Revista Română de Medicină de Laborator* 2010, 18:7-13
- 2 GHAZI A, GRANT A. Hereditary angioedema: epidemiology, management, and the role of icatibant, *Biologics: targets & therapy* 2013, 7:103-113
- 3 LUMRY R W. Overview of epidemiology, pathophysiology, and disease progression in hereditary angioedema, *The American journal of managed care* 2013, 19:103-110
- 4 BOWEN T, CICARDI M, BORK K, ZURAW B, FRANK M, RITCHIE B, FARKAS H, VARGA L, ZINGALE CL, BINKLEY K, WAGNER E, ADOMAITIS P, BROSZ K, BURNHAM J, WARRINGTON R, KALICINSKY C, MACE S, MCCUSKER C, SCHELLENBERG R, CELESTE L, HEBERT J, VALENTINE K, POON M, SERUSHAGO B, NEURATH D, YANG W, LACUESTA G, ISSEKUTZ A, HAMED A, KAMRA P, DEAN J, KANANI A, STARK D, RIVARD G, LEITH E, TSAI E, WASERMAN S, KEITH K P, PAGE D, MARCHESIN S, LONGHHURST J H, KREUZ W, RUSICKE E, MARTINEZ- SAGUAR I, AYGOREN- PURSUN E, HARMAT G, FUST G, LI H, BOUILLET L, CABALLERO T, MOLDOVAN D, SPATH J P, SMITH-FOLTZ S, NAGY I, NIELSEN W E, BUCHER C, NORDENFELT P, XIANG YU ZHI. Hereditary angioedema: a current state-of-the-art review, VII: Canadian Hungarian 2007 International Consensus Algorithm for the Diagnosis, Therapy, and Management of Hereditary Angioedema, *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008,100:30-40
- 5 WEIS M. Clinical review of hereditary angioedema: diagnosis and management, *Postgraduate medicine* 2009, 121:113-120
- 6 ZURAW B. Hereditary angioedema, *N Engl J Med* 2008, 359:1027-1036
- 7 haeimages.com
- 8 DAVIS A, WHITEHEAD A, HARRISON R, DAUPHINAIS A, BRUNS G, CICARDI M, ROSEN F. Human inhibitor of the first component of complement, C1: Characterization of cDNA clones and localization of the gene to chromosome 11, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986, 83: 3161-3165
- 9 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/710>
- 10 BATZER MA, DEININGER PL. Alu repeats and human genomic diversity, *Nat Rev Genet.* 2002,;3(5):370-9.
- 11 STOPPA-LYONNET D, CARTER P, MEO T, TOSI M. Clusters of intragenic Alu repeats predispose the human C1 inhibitor locus to deleterious rearrangements, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87:1551-1555
- 12 BUTLER J, KADONAGA J. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression, *Genes & Development* 2002,16: 2583-2592
- 13 ZAHEDI K, BISSLER J, PRADA A E, PRADA A J, DAVIS A E. The Promoter of the C1 Inhibitor Gene Contains a Polypurine - Polypyrimidine Segment that Enhances Transcriptional Activity, *The Journal of Immunology* 1999, 162: 7249-7255
- 14 DAVIS L R, FIRULLI B A, KINNIBURGH J A. Ribonucleoprotein and protein factors bind to an H-DNA-forming c-myc DNA element: Possible regulators of the c-myc gene, *Proc. Naid. Acad. Sci. USA* 1989, 86:9682-9686
- 15 PRADA A E, ZAHEDI K, DAVIS A E. Regulation of C1 Inhibitor Synthesis, *Immunobiol* 1998, 199: 377-388
- 16 JOHNSON A M, ALPER C A, ROSEN F S, CRAIG L M. C1 inhibitor: evidence for decreased hepatic synthesis in hereditary angioneurotic edema, *Science* 1971, 173: 553-554
- 17 WALKER D G, YASUHARA O, PATSON P A, MCGEER E G, MCGEER P L. Complement C1 inhibitor is produced by brain tissue and is cleaved in Alzheimer disease, *Brain Research* 1995, 675:75-82.
- 18 KATZ Y, STRUNK R. Synthesis and regulation of C1 inhibitor in human skin fibroblasts, *Immunol.*1989, 142:2041-2045.

- 19 LAPPIN D, GUC D, HILL A, MCSHANE T, WHALEY K. Effect of interferon-gamma on complement gene expression in different cell types, *Biochem.* 1992, 281:437-442
- 20 ENDRESEN G K M. Immunological studies of plasma protease inhibitors associated with human blood platelets. *Thromb. Res.* 1980,19:157-163
- 21 SCHMAIER A H, SMITH P M, COLMAN R W. Platelet C1 inhibitor. A secreted alpha- granule protein, *J. Clin. Invest.* 1985, 75:242-250
- 22 GELFAND J, SHERINS R, ALLING D, FRANK M. Treatment of hereditary angioedema with danazol, Reversal of clinical and biochemical abnormalities. *N. Engl. J.med.* 1976, 295:1444-1484
- 23 LAPPIN D F, GUC D, HILL A, MCSHANE T, WHALEY K. Effect of interferon-γ on complement gene expression in different cell types, *Biochem. J.* 1992, 281:437-42
- 24 ZAHEDI K, PRADA A E, DAVIS A E. Transcriptional Regulation of the C1 Inhibitor Gene by γ- Interferon, *The Journal Of Biological Chemistry* 1994, 269:9669-9674
- 25 LAPPIN F D, BIRNIE D G, WHALEY K. Modulation by interferons of the expression of monocyte complement genes, *Biochem. J.* 1990, 268:387-392
- 26 SCHMIDT B ,GYAPAY G, VALAY M, FUST G. Human recombinant macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) increases C1-esterase inhibitor (C1-INH) synthesis by human monocytes, *Immunology* 199, 74:677-679
- 27 STEEL M D, WHITEHEAD S A. Heterogeneous modulation of acute-phase-reactant mRNA levels by interleukin-1β and interleukin-6 in the human hepatoma cell line PLC/PRF/5, *Biochem. J.* 1991, 277:477-482
- 28 ZURAW L B, LOTZ M. Regulation of the Hepatic Synthesis of C1 Inhibitor by the Hepatocyte Stimulating Factors Interleukin 6 and Interferon γ, *The Journal Of Biological Chemistry* 1990, 265:12664-12670
- 29 BOCK C S , SKIVER K, NIELSEN E, THERGERSEN H C, WIMAN B, DONALDSON H V, EDDY L R, MARRISAN J. RADZIEJEWSKA E, HUBER R. SHOWS B T, MAGNUSSON S. Human C1 inhibitor: primary structure, cDNA cloning, and chromosomal localization, *Biochemistry.* 1986, 25(15):4292-301.
- 30 PERKINS S J, SMITH K F, AMATAYAKUL S, ASHFORD D, RADEMACHER T W, DWEK R A, LACHMANN P J, HARRISON R A. 1990. Two-domain structure of the native and reactive centre cleaved forms of C1 inhibitor of human complement by neutron scattering, *J. Mol. Biol.* 214: 751.
- 31 BOS G A I, HACK C E, ABRAHAMS J P. Structural and Functional Aspects of C1-Inhibitor, *Immunobiol.* 2002, 205:518–533
- 32 BEINROHR L, HARMAT V, DOBÓ J, LÖRINCZ Z, GÁL P, ZÁVODSZKY P. C1 inhibitor serpin domain structure reveals the likely mechanism of heparin potentiation and conformational disease , *J Biol Chem.* 2007 Jul 20;282(29):21100-9
- 33 KAPLAN P. A. Enzymatic pathways in the pathogenesis of hereditary angioedema: the role of C1 inhibitor therapy, *J Allergy Clin Immunol.* 2010,126:918-25
- 34 STENSON PD, MORT M, BALL EV, SHAW K, PHILLIPS A, COOPER DN. The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine, *Hum Genet.* 2014, 133(1):1-9
- 35 SKRIVER K, RADZIEJEWSKA E, SILBERMANN JA, DONALDSON VH, BOCK SC . CpG mutations in the reactive site of human C1 inhibitor, *J Biol Chem.* 1989 Feb 25;264(6):3066-71
- 36 [http://hae.enzim.hu/result.php?q\\_uid=\\*](http://hae.enzim.hu/result.php?q_uid=*)
- 37 KALMÁR L, HEGEDÜS T, FARKAS H, NAGY M, TORDAI A. HAEdb: a novel interactive, locus-specific mutation database for the C1 inhibitor gene, *Hum Mutat* 2005 Jan, 25(1):1-5
- 38 SANGER F, NICKLEN S, COULSON A R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 1977, 74 (12):5463-5467
- 39 MARDIS E R. Next-Generation Sequencing Platforms, [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org)
- 40 [https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/sequencing/sanger-sequencing/sanger\\_sequencing\\_method.html](https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/sequencing/sanger-sequencing/sanger_sequencing_method.html).
- 41 KARGER L B, GUTTMAN A. DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis, *Electrophoresis* 2009, 30:196–202

- 
- 42 NEIL H. Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology, *The Journal of Experimental Biology* 2007, 209:1518-1525
- 43 DIJK L E, AUGER H, JASZCZYSZYN Y, THERMES C. Ten years of next generation sequencing technology, *Trends Genet.* 2014, 30(9):418-26
- 44 <http://www.thermofisher.com/gr/en/home.html>
- 45 SHENDURE J, JI H. Next-generation DNA sequencing, *Nature Biotechnology* 2008, 26 (10):1135-1145
- 46 DRESSMAN D, YAN H, TRAVERSO G, KINZLER W K, VOGELSTEIN B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100(15):8817–8822.
- 47 ADESSI C, MATTON A, AYALA G, TURCATTI G, MERMOD J, MAYER P, KAWASHIMA E. Solid phase DNA amplification: characterisation of primer attachment and amplification mechanisms, *Nucleic Acids Res.* 2000 28(20): e87
- 48 FEDURCO M, ROMIEU A, WILLIAMS S, LAWRENCE I, TURCATTI G. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies, *Nucleic Acids Res.* 2006; 34(3): e22
- 49 MARGULIES M, EGHOLM M, ALTMAN E W, ATTIYA S, BADER S J, BEMBEN A L, BERKA J, BRAVERMAN S M, CHEN YI-JU, CHEN Z, DEWELL B S, LEI DU L, FIERRO M J, GOMES V X, GODWIN B, HE W, HELGESEN S, CHUN HE HO, IRZYK P G, JANDO C S, ALLENQUER M L I, JARVIEP T, JIRAGE B K, KIM JB, KNIGHT R J, LANZA R J, LEAMON H J, LEFKOWITZ M S, LEI M, LI J, LOHMAN L K, LU H, MAKHIJANI B V, MCDADE E K, MCKENNA P M, MYERS W E, NICKERSON E, NOBILE R J, PLANT R, PUC P B, RONAN T M, ROTH T G, SARKIS J G, SIMONS F J, SIMPSON W J, SRINIVASAN M, TARTARO R K, TOMASZ A, VOGT A K, VOLKMER A G, WANG H S, WANG Y, WEINER P M, YU P, BEGLEY F R, ROTHBERG M J Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors, *Nature* 2005, Vol. 437:376–380
- 50 RONAGHI M, KARAMOHAMED S, PETTERSSON B, UHLÉN M, NYRÉN P. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release, *Anal Biochem* 1996, 242(1):84-89
- 51 TURCATTI G, ROMIEU A, FEDURCO M, TAIRI AP. A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis, *Nucleic Acids Res.* 2008 36(4):e25.
- 52 [http://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina\\_sequencing\\_introduction.pdf](http://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf).
- 53 <http://www.454.com/>
- 54 <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4462921?ICID=search-product>